



TITLE:

原索動物ホヤの筋肉アクチン遺伝子の構造と発現調節(
Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

日下部, 岳広

CITATION:

日下部, 岳広. 原索動物ホヤの筋肉アクチン遺伝子の構造と発現調節. 京都大学, 1994, 博士(理学)

ISSUE DATE:

1994-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3075816>

RIGHT:

②

主論文

原索動物ホヤの筋肉アクチン遺伝子の構造と発現調節

(Muscle actin genes in the ascidian *Halocynthia roretzi*:
structure, organization and transcriptional regulation)

京都大学理学部動物学教室

日下部岳広

目次

(ページ)

序論	1
材料と方法	3
1. マボヤの成体および胚の採集	
2. ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法	
3. 放射性標識プローブ	
4. ゲノムDNAライブラリーの作製とスクリーニング	
5. ゲノムDNAクローンの構造解析	
6. 塩基配列の決定	
7. RNAの調製	
8. サザンブロット解析	
9. ノーザンブロット解析	
10. 転写開始点の決定	
11. <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション	
12. プロモーター-レポーター融合遺伝子の構築	
13. 核抽出液	
14. ゲルシフトアッセイ法	
結果	9
1. マボヤ尾芽胚由来の筋肉型アクチンcDNAの塩基配列	
2. マボヤ幼生筋アクチン遺伝子の発現様式	
(1) 初期発生過程および幼生における発現	
(2) 変態過程および成体における発現	
3. マボヤ幼生筋アクチン遺伝子の単離と構造	
(1) <i>HrMA2/HrMA4</i> アクチン遺伝子クラスター	
(2) <i>HrMA1</i> アクチン遺伝子対	
4. 顕微注入法によるアクチン遺伝子プロモーターの機能解析	
(1) <i>HrMA4a-lacZ</i> 融合遺伝子の発現	
(2) <i>HrMA1a-lacZ</i> 融合遺伝子の発現	
5. 筋肉特異的な転写調節に関わるタンパク質因子の検索	
考察	23
1. 幼生型筋肉アクチン遺伝子の発現様式	
2. 幼生型筋肉アクチン遺伝子のgenomic organization	
3. なぜ複数のアクチン遺伝子が幼生の筋肉で発現しているのか	
4. 筋肉特異的転写に関わる調節配列と転写調節因子	
5. ホヤにおける筋肉アクチン遺伝子ファミリー	
謝辞	32
引用文献	33
図と表	40

序論

受精卵という1個の細胞から、多数の細胞からなる統合された動物の体へと発生していく過程で、それぞれに特徴的な機能と形質を持った細胞が分化してくる機構の解明は、発生生物学の中心的な研究課題の1つである。古くからの実験発生学的な知見に、近年の分子生物学的、発生工学的技術の進歩に支えられた成果が加わり、細胞分化がタンパク質や核酸を中心とした分子間の相互作用に基づく現象として記述され、理解されつつある。しかしながら、卵に始まり最終的にある特定の細胞分化に至る過程には、卵細胞質に蓄えられた情報分子、DNA複製と細胞分裂、染色体DNAの状態、細胞間相互作用、転写調節など数々の要素が含まれており、いまだどの動物のいかなる細胞・組織についてもこれを統一的に理解するには至っていない (Davidson, 1986; 1993; Slack, 1991)。

ホヤ（原索動物、尾索類）の幼生の尾部には約40個の筋肉細胞が存在しており、これらの細胞系譜はほぼ完全に解明されている (Conklin, 1905; Nishida and Satoh, 1983; 1985; Nishida, 1987)。マボヤ *Halocynthia roretzi* の場合、正確に42個の筋肉細胞が分化し、このうち尾の前側の28個の筋肉細胞は8細胞胚のB4.1割球対に由来する（第一次筋肉系統）。第一次筋肉系統の細胞は自律的な筋分化能を示し、その分化は卵の筋肉細胞質（マイオプラズム）と呼ばれる細胞質に含まれる分化決定因子に支配されていると考えられている (Satoh *et al.*, 1990; Swalla, 1992)。一方、尾の先端の14個の筋肉細胞は8細胞胚のA4.1およびb4.2割球対に由来する（第二次筋肉系統）。第二次筋肉系統の細胞は自律的分化能をもたず、その分化には細胞間相互作用が必要であることが示唆されている (Nishida, 1990)。このような特徴をもつホヤ胚の筋肉細胞分化は、卵から最終的な細胞分化に至るまでのすべての道筋を分子間の相互作用に基づいて明らかにする上で優れた実験系と考えられる。

組織特異的に発現する遺伝子を単離し、その細胞分化に伴う発現調節機構を解析することは、細胞分化を研究する上で非常に有効な手段の1つと考えられる。ホヤでは筋肉特異的遺伝子として、アクチン (Tomlinson *et al.*, 1987; Beach and Jeffery,

1992), ミオシン重鎖 (Makabe and Satoh, 1989), トロポミオシン (Meedel and Hastings, 1993) のcDNAが単離され, その発現様式が調べられている. しかしこれらの研究はcDNAをプローブとしてその発現パターンを解析するにとどまっており, 筋肉特異的遺伝子を含むゲノムDNAクローンを単離し, その発現調節機構を調べるまでには至っていない. 本研究ではホヤ胚の筋肉細胞分化の分子機構を明らかにする目的で, マボヤの幼生の筋肉で特異的に発現するアクチン遺伝子を単離して, その構造を明らかにし, さらに筋肉特異的な発現調節機構について解析をおこなった.

まず, マボヤ幼生の筋肉で特異的に発現する複数の筋肉アクチンのcDNAの塩基配列を決定し, その発現様式を調べた. 次にこれらのcDNAをプローブに用いて7個の筋肉アクチン遺伝子を単離し, その構造を調べた. その結果, (1) マボヤでは複数の筋肉アクチン遺伝子が幼生の筋肉で特異的に発現し, その転写は囊胚期から開始すること, (2) これらの遺伝子のうち5個は染色体上でクラスターを形成すること, (3) 別の2個の遺伝子は隣接したプロモーターから互いに逆向きに転写される遺伝子対を作っていること, が明らかになった. さらに(4) 顕微注入法を用いた解析により, これらの遺伝子の比較的短い上流領域が筋肉特異的な転写に十分であることを明らかにし, また(5) ゲルシフト法によって転写調節領域付近に特異的に結合する核タンパク質を検出した. これらの結果は, 組織特異的な転写活性化の機構を解明する手がかりになるとともに, 1個の卵から特定の細胞が分化してくるまでの一連の分子カスケードを明らかにする端緒ともなり得ると思われる.

材料と方法

一般的な分子生物学的手法については細部を省略して記述した。これらの方法は基本的にSambrook *et al.* (1989)に従った。

1. マボヤの成体および胚の採集

マボヤの成体は東北大学理学部附属浅虫臨海実験所近辺または東京大学海洋研究所附属大槌臨海研究センター近辺で購入した。成体の組織は使用直前まで -80°C で保存した。適当な大きさの容器に1個体ずつ別々に入れ、容器内で放卵・放精をさせた後、卵を集めて他個体の精子と受精させることにより受精卵を得た。受精卵は 11°C から 13°C で発生させた。この温度では受精後約24時間で尾芽胚になる。胚は低速遠心により回収し速やかに冷凍、 -80°C で保存した。

2. ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法

基本的に全てのPCR増幅反応はTaqDNAポリメラーゼ (Promega社) を用いて以下に述べる条件でおこなった。反応液の組成はSambrook *et al.* (1989)に従った。 $94^{\circ}\text{C} \cdot 1$ 分、 $42^{\circ}\text{C} \cdot 2$ 分、 $72^{\circ}\text{C} \cdot 3$ 分を1サイクルとし、30サイクルの増幅反応をおこなった。オリゴヌクレオチドプライマーはApplied Biosystems社製のDNA合成機を用いて合成した。

3. 放射性標識プローブ

本研究で用いたプローブは、(1) HrcMA4 cDNAの3'側非翻訳領域から作製したもの (MA4-N), (2) HrcMA4 cDNAの翻訳領域から作製したもの (MA4-C), (3) HrcMA2 cDNAの翻訳領域から作製したもの (MA2-C), (4) HrcMA1 cDNAの3'非翻訳領域に由来するもの (MA1-N), (5) HrcMA1 cDNAの全長からなるもの (MA1-F) の5種類である (各cDNAについては「結果」で述べる)。cDNAから制限酵素により切り出したDNA断片またはPCR法により増幅したDNA断片を

pBluescriptII SK(+)ベクター (Stratagene社) に組み込みクローン化した。MA4-Nについては³²P標識RNAプローブをT3 RNAポリメラーゼ (宝酒造) を用いて合成し、MA4-C, MA2-C, MA1-N, MA1-Fについては³²P標識DNAプローブをKlenow酵素 (Boehringer Mannheim社) を用いてランダムプライマー法で合成した。

4. ゲノムDNAライブラリーの作製とスクリーニング

1 個体のマボヤ生殖腺からKupiec *et al.* (1987)の方法によりゲノムDNAを調製した。ゲノムDNAを*Sau3AI*で部分的に消化し、ショ糖密度勾配遠心法により分画して、およそ15 kbから23 kbの長さのDNA断片を得た。次に、このDNA断片の*Sau3AI*切断末端をdATP, dGTPを基質として部分的にfill-inし、あらかじめdCTPとdTTPを用いてfill-inされている λ FIXIIベクター (Stratagene社) の*XhoI*部位に組み込んだ。ゲノムDNA断片を組み込んだベクターを*in vitro*でパッケージングしてゲノムDNAライブラリーとした。タイター測定の結果、このライブラリーの独立クローンの数は 2×10^6 pfu (plaque forming units)と推定された。このうち 1×10^6 pfuを大腸菌P2PLK17株を宿主として増幅し、その一部をスクリーニングに使用した。スクリーニングには大腸菌P2392株を宿主として用いた。スクリーニングに用いたプローブはMA4-NとMA1-Nである。

5. ゲノムDNAクローンの構造解析

単離したゲノムDNAクローンの制限酵素地図をGene Mapping Kit(Stratagene社)を用いて決定した。クローン内部のアクチン遺伝子の位置および方向は、HrcMA4 cDNAの翻訳領域をプローブに用いたサザンハイブリダイゼーションの結果と、PCR法を組み合わせで決定した。決定した制限酵素地図を参考にゲノムDNAクローンを適当な制限酵素で切断し、得られた断片をpBluescriptII SK(+)にサブクローン化して以後の解析に用いた。制限酵素地図の結果は各サブクローンの部分塩基配列を決定して確認した。

6. 塩基配列の決定

サブクローン化した二本鎖DNAを直接鋳型として塩基配列を決定した。方法はSequenase version 2.0を用いたジデオキシ法 (Sanger *et al.*, 1977) である。Applied Biosystems社製のDNAシンセサイザーで合成したオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いて、二本鎖の両方の鎖の塩基配列を決定した。電気泳動には8%ポリアクリルアミドゲルを使用した。

7. RNAの調製

凍結した胚および成体の試料を10倍量の変性バッファー (5.5 M guanidium thiocyanate, 25 mM sodium citrate (pH7.0), 0.5% N-laurylsarcosyl, 0.2 M 2-mercaptoethanol) 中でホモジナイズし、APGC法 (Chomczynski and Sacchi, 1987) によってtotal RNAを調製した。ポリ(A)⁺ RNAの精製にはOligotex-dT30 (Roche社) を用いた。

8. サザンブロット解析

10 μ gのゲノムDNAまたは1 μ gのゲノムDNAクローンを制限酵素で消化し、0.7%アガロースゲルを用いた電気泳動により分離した。泳動後、ゲルを0.25 M HCl 溶液に15分間浸した。次に、0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl溶液に移し30分間変性処理をした後、1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl (pH7.2), 1 mM EDTA溶液に30分間浸し中和処理をおこなった。次に、20xSSC (1xSSCの組成は0.15 M NaCl, 0.015 M sodium citrate pH7.0) を用いてゲル中のDNA断片をナイロン膜フィルター (Hybond-N, Amersham 社) 上に移した。DNAを移したナイロン膜フィルターを乾燥し感熱処理をおこなった後、42℃で2時間から4時間プレハイブリダイゼーションをおこなった。プレハイブリダイゼーション液の組成は50% formamide, 5xDenhardt's solution (Denhardt, 1966), 5xSSPE (1xSSPEの組成は0.18 M NaCl, 0.01 M sodium phosphate, 1 mM EDTA pH7.7), 250 μ g/ml salmon sperm DNA, 0.5% SDSである。次に、放射性標識したプローブをプレハイブリダイゼーション液に加え、42℃で12時間から16時間ハイブリダイゼーションをおこなった。ハイブリダイゼーション後、フィルターを

2xSSC, 0.1% SDS溶液中50℃で1.5時間（30分を3回）洗浄した。強い洗浄が必要な場合には、さらに0.1xSSC, 0.1% SDS溶液中65℃で15分間の洗浄をおこなった。洗浄したフィルターは、サランラップで包み増感紙を一枚使用して、-80℃で数時間から数日間X線フィルムに露光した。

9. ノーザンブロット解析

10 μ gのポリ(A)⁺ RNAまたは15 μ gのtotal RNAを、6%ホルムアミドを含む1%アガロースゲルを用いた電気泳動により分離した。泳動後のゲルを蒸留水で洗浄し、1xSSC, 50 mM NaOH溶液で20分間処理した後、0.1M Tris-HCl (pH7.5)で20分間中和した。次にゲルを20xSSCに1時間浸した後、ナイロン膜フィルターへの転写をおこなった。転写、ハイブリダイゼーション、洗浄、露光はノーザンブロット解析と同様の方法でおこなった。

10. 転写開始点の決定

プライマー伸長法により転写開始点を決定した。方法は基本的にMcKnight and Kingsbury (1982)に従った。³²P- γ -ATPを用いて末端標識したオリゴヌクレオチドプライマーと8 μ gのポリ(A)⁺ RNAを混合し、65℃で10分間加熱した後、ゆっくりと室温まで戻してアニーリング反応をおこなった。伸長反応はMoloney murine leukemia virus (M-MLV)逆転写酵素（Promega社）を用いて42℃で90分間おこなった。反応産物の解析には8%ポリアクリルアミドゲルを用いた。

11. *in situ*ハイブリダイゼーション

切片上での*in situ*ハイブリダイゼーションは基本的にTomlinson *et al.* (1987)で述べられている方法に従った。ハイブリダイゼーション・洗浄の後、Jeffery *et al.* (1983)の方法でオートラジオグラフィーをおこなった。プローブには³⁵S標識したRNAプローブを用いた。

ホールマウント*in situ*ハイブリダイゼーションはYasuo and Satoh (1993b)に記載

されている方法に従った。プローブにはDIG RNA Labeling Kit(Boehringer Mannheim社)によりdigoxigenin標識したRNAプローブを用いた。

1 2. プロモーター-レポーター融合遺伝子

アクチン遺伝子上流領域と大腸菌 β -ガラクトシダーゼ遺伝子 (*lacZ*) を接続した融合遺伝子プラスミドを12種類作製した(図16)。pHrMA4a-Zは、*HrMA4a*の転写開始点の1.4 kb上流にある*EcoRI*部位から転写開始点の10 bp下流の*HindIII*部位までの約1.4 kbのDNA断片を、pSV- β -Galactosidase vector (Promega社)の*lac-Z*遺伝子上流の*HindIII*部位に接続し作製した。pHrMA4a-Z(Δ 216), pHrMA4a-Z(Δ 103), pHrMA4a-Z(Δ 61)はpHrMA4a-Zの上流領域をmung-bean nucleaseおよびexonuclease IIIを用いて5'側から削ったものである。pHrMA1a-Z, pHrMA1a-Z(190), pHrMA1b-Z(190), pHrMA2-Z(190), pHrMA4a-Z(190), pHrMA4b-Z(190), pHrMA5-Z(190), pHrMA6-Z(190)の8種類の融合遺伝子プラスミドは、各々のアクチン遺伝子上流領域をPCR法により増幅し、pHrMA4a-Zの上流領域と入れ換えることにより作製した。

制限酵素により直鎖状にした融合遺伝子プラスミドをHikosaka *et al.* (1992)に述べられている方法で受精卵に顕微注入した。融合遺伝子を導入した胚は尾芽胚期まで発生させた後、Hikosaka *et al.* (1992)の方法に従って β -ガラクトシダーゼ活性を組織化学的に検出した。

1 3. 核抽出液

核抽出液調製用の胚は次のようにして調製、保存した。マボヤ尾芽胚のコリオンをMita-Miyazawa *et al.* (1985)に述べられている方法で除去した。コリオンを除去した胚は氷冷した Ca^{2+} ・ Mg^{2+} 除去海水 (10 mM Tris-HCl (pH7.5), 1 mM EDTAを含む)で洗った後、ホモジナイズ用緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH7.5), 1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol (DTT), 12.5% (w/v) sucrose) に懸濁した。次に、ホモジナイズ用緩衝液中の胚を低速遠心により集め速やかに冷凍、 -80°C で保存した。

凍結試料からの核抽出液の調製は次のようにおこなった。約5 mlの凍結した胚

を氷上で融解し、30 mlの氷冷したホモジナイズ用緩衝液（1 mM PMSF入り）を加えてダウンスホモジナイザーでホモジナイズした。次に遠心（1100xg, 4℃, 10分）によって核を回収し、5 mlの核抽出用緩衝液（10 mM HEPES-NaOH (pH7.9), 0.42 M NaCl, 100 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 25% (v/v) glycerol, 1 mM PMSF）に再懸濁した。核懸濁液を4℃に30分間置いて核タンパク質の抽出をおこなった後、25000xg, 4℃で30分間遠心した。遠心後、上清を回収し、透析用緩衝液（20 mM HEPES-NaOH (pH7.9), 100 mM KCl, 12.5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 2 mM DTT, 20 % glycerol, 1 mM PMSF）に対して透析をおこなった（4℃, overnight）。透析後の核抽出液は遠心（25000xg, 4℃, 30分）によって不溶性のタンパク質を取り除いた後、分注して-80℃で保存した。核抽出液のタンパク質濃度は色素結合法（Protein Assay Kit, Bio-Rad Laboratories社）により測定した。本研究で用いた神経胚核抽出液のタンパク質濃度は2 mg/mlであった。

1.4. ゲルシフトアッセイ法

ゲルシフトアッセイに用いたオリゴヌクレオチドはApplied Biosystems社製オリゴヌクレオチド合成機により合成した。等量の相補的な2種類の1本鎖オリゴヌクレオチドを混合し、95℃で3分間加熱した後、ゆっくりと室温まで冷やすことにより2本鎖オリゴヌクレオチドを作製した。本研究で使用したオリゴヌクレオチドの塩基配列を図1.9Bに示した。2本鎖オリゴヌクレオチドはKlenow酵素を用いて³²P- α -dGTPで標識した。結合反応液（12.5 μ l）の組成は、核タンパク質12 μ g, ポリ(dI-dC):ポリ(dI-dC) 1 μ g, サケ精子DNA 1 μ g, ³²P標識プローブ0.4 fmol, 10 mM Tris-HCl (pH7.5), 5% glycerol, 1 mM DTT, 2 mM EDTAとした。室温30分間の結合反応の後、6%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動をおこなった。泳動に使用した緩衝液は1xTAE(6.7 mM Tris-HCl (pH8.0), 3.3 mM Na-acetate, 1 mM EDTA)である。泳動後ゲルを乾燥し、増感紙を一枚使用して-80℃で1日から数日間X線フィルムに露光した。

結果

1. マボヤ尾芽胚由来の筋肉型アクチン cDNAの塩基配列

シロボヤ筋肉アクチンcDNA SpMA3 (Tomlinson *et al.*, 1987) を用いて, マボヤ尾芽胚cDNAライブラリー (Makabe and Satoh, 1989) をスクリーニングすることにより得られていた, 6 個のアクチンcDNAクローンの塩基配列を決定し, その比較をおこなった. その結果, 非翻訳領域も含めた塩基配列がほぼ同一であるものが2組見つかり, 結局4種類の異なるcDNAが得られた (図1A). これらのcDNAをそれぞれHrcMA1, HrcMA2, HrcMA3, HrcMA4と命名した. また, 各々に対応する遺伝子はcをはずしてHrMA1, HrMA2のように呼ぶものとする. 4種類のcDNAはいずれも脊椎動物の筋肉アクチンによく似たアクチンタンパク質をコードしており, 幼生の筋肉で発現するアクチンのcDNAであることが予想された. 4種類のcDNAのうち, HrcMA2, HrcMA3, HrcMA4の塩基配列は非翻訳領域を含め互いに非常によく似ていたのに対し, HrcMA1の非翻訳領域は他の3つのcDNAとはまったく似ておらず, 翻訳領域においてもコドンの3番目の塩基の違いが目立った (図1B).

図2にHrcMA4の全塩基配列を示した. HrcMA4は378アミノ酸をコードする1137 bpの翻訳領域と55 bpの5'側非翻訳領域および100 bpの3'側非翻訳領域からなり, 3'末端にはポリA鎖が接続している. 脊椎動物のアクチンは細胞骨格型と筋肉型に大別され, 各々のタイプを特徴づけるアミノ酸部位が19箇所知られている

(Vandekerckhove and Weber, 1978; 1979). これらのアミノ酸部位に関して, HrcMA4がコードするアクチンと脊椎動物の細胞骨格アクチンおよび筋肉アクチンとの比較をおこなったところ, 19箇所のうち17箇所が筋肉アクチン型のアミノ酸であり, 1箇所が細胞骨格型, 残りの1箇所はどちらとも異なっていた (表1). 一般に無脊椎動物のアクチンは, たとえ筋肉で発現し筋繊維を構成するアクチンであっても, 脊椎動物の筋肉アクチンよりも細胞骨格アクチンに近いアミノ酸配列をもっていることが知られている (表1; Vandekerckhove and Weber, 1984; 日下部・佐藤, 1993). しかしHrMA4アクチンのアミノ酸配列は明らかに脊椎動物の筋肉型アイソフォーム

のものに近い。

2. マボヤ幼生筋アクチン遺伝子の発現様式

cDNAより作製したプローブを用いて、これらのcDNAに対応するアクチン遺伝子の空間的および時間的な発現様式を調べた。用いたプローブはHrcMA4の3'側非翻訳領域から作製したもの（MA4-N）、HrcMA2、HrcMA3、HrcMA4の3者でほぼ共通な翻訳領域からなるもの（MA4-C, MA2-C）、HrcMA1の3'非翻訳領域に由来するもの（MA1-N）、HrcMA1の全長からなるもの（MA1-F）の4種類である。

（1）初期発生過程および幼生における発現

図3はMA4-Nを用いておこなった尾芽胚の切片に対する*in situ*ハイブリダイゼーションである。尾部の筋肉細胞にのみシグナルが検出され、将来成体の体壁筋を形成すると考えられている間充細胞にはシグナルは検出されなかった。この結果はHrMA4 mRNAが胚において筋肉細胞で特異的に発現することを示している。

図4はMA4-Nを用いてHrMA4遺伝子の時間的な発現様式の解析をおこなったものである。未受精卵、受精卵、8細胞胚、64細胞胚、囊胚、神経胚、初期尾芽胚、後期尾芽胚および遊泳幼生から調製したポリ(A)⁺ RNAを用いてノーザンブロット解析をおこなった結果、未受精卵、受精卵、8細胞胚、64細胞胚ではシグナルは検出されなかった（図4A）。囊胚期になると、約1.5 kbの長さの単一のバンドが初めて検出されるようになる。その後、神経胚から尾芽胚にかけてシグナルが強くなり、後期尾芽胚期には最大に達した（図4A）。また孵化後の幼生では、後期尾芽胚よりは少ないものの、明らかに発現が認められた。以上の結果は、HrMA4遺伝子の転写が囊胚期（受精後約9時間）に始まり、mRNAは神経胚期（受精後約12時間）までに急速に蓄積すること、その発現は筋肉細胞に特異的であることを示している。

先述のようにHrcMA2、HrcMA3、HrcMA4の3つは翻訳領域、非翻訳領域ともによく似通っており、翻訳領域はほぼ同一の塩基配列をもっている（98%以上が同

じ)。したがって、これらのcDNAのうちどれか1つの翻訳領域をプローブに用いると、それぞれのcDNAに対応する転写産物のいずれをも検出すると考えられる。図5はこのようなプローブMA4-Cを用いておこなったマボヤ胚のホルマウント *in situ* ハイブリダイゼーションである。シグナルは神経胚および尾芽胚の将来幼生の筋肉になる細胞にのみ検出された。この結果は、*HrMA2*や*HrMA3*も*HrMA4*遺伝子と同様に幼生の筋肉で特異的に発現するアクチン遺伝子であることを示唆している。*HrMA2*や*HrMA3*が*HrMA4*とは時間的に異なる発現様式を示す可能性や、それぞれの遺伝子が異なる筋肉細胞で発現している可能性を否定することはできないが、すくなくともMA4-Nを用いた *in situ* ハイブリダイゼーションでは第一次筋肉系統と第二次筋肉系統の細胞の両方でシグナルがみられる(図3)。

*HrMA1*の塩基配列は翻訳領域、非翻訳領域のどちらにおいても他の3つのcDNAとは異なっており、特に非翻訳領域ではまったく類似性がみられない。*HrMA1*遺伝子の発生過程における発現様式を調べるために、MA1-Nを用いてノーザンブロット解析をおこなった(図6A)。受精卵および卵割期の胚にはmRNAは検出されず、囊胚期に初めて転写産物が検出されるようになり、その後、発生が進むにつれてその量は増加していく。こうした*HrMA1*の時間的な発現様式は*HrMA4*のものと同じである。

(2) 変態過程および成体におけるアクチン遺伝子の発現

マボヤの幼生は孵化後しばらく遊泳したのち幼若個体へと変態するが、このとき幼生の筋肉細胞は失われ、新たに別の起源をもつ成体の筋肉が作られる。そこで、変態前後の*HrMA4*転写産物の量の変化、および各cDNAに対応する転写産物の成体における発現を調べた。

MA4-Nを用いて、変態開始後の幼生および幼若個体から調製したポリ(A)⁺RNAのノーザンブロット解析をおこなった(図4B)。MA4-Nによって検出されるシグナルは変態後徐々に減少し、変態後11日以降には検出されなくなった。この結果は*HrMA4* mRNAが変態後消失することを示唆している。しかし、*HrMA4*以外の

アクチン遺伝子の発現は変態後も持続している可能性や、成体の筋肉の発達にともなって再び*HrMA4*遺伝子の転写が活性化される可能性も考えられる。こうした可能性を検討するために、MA2-C、MA1-Fをプローブに用いてそれぞれ成体の各組織に対するノーザンブロット解析をおこなった。その結果いずれのプローブを用いた場合にも、筋肉組織である体壁や心臓を含め、どの組織においてもこれらのアクチン遺伝子の発現は認められなかった（図7A、図6B）。またMA4-Cを用いておこなった結果も同様であった（data not shown）。これらの結果から、尾芽胚から得られた4種類のアクチンcDNAはどれも胚から幼生にかけてのみ発現する遺伝子に由来すると考えられる。

一方、MA2-Cプローブを用いてより緩やかなハイブリダイゼーションの条件で成体組織のノーザンブロット解析をおこなった場合には、体壁と心臓においてシグナルが検出されたが、非筋肉組織ではまったく検出されなかった（図7B）。また、バンドの移動度には体壁と心臓で若干の違いがみられ、この移動度の差は独立におこなった別のプロットでも再現された。これらの結果から、成体の筋肉組織である体壁筋と心筋では幼生の筋肉のものとは異なる筋肉アクチン遺伝子が発現していることが示唆される。また、さらに検討が必要ではあるが、バンドの移動度に違いがみられることから体壁筋と心筋とで異なるアクチン遺伝子が発現している可能性が考えられる。

3. マボヤ幼生筋アクチン遺伝子の単離と構造

cDNAを用いた解析から、*HrMA1*、*HrMA2*、*HrMA3*、*HrMA4*はいずれも幼生の筋肉細胞で発現するアクチン遺伝子であることが示唆された。これらの遺伝子の発現調節機構、特に筋肉特異的転写調節機構を明らかにする目的で、マボヤゲノムDNAライブラリーを作製し、cDNAから作製したプローブを用いてアクチン遺伝子クローンの単離をおこなった。

(1) *HrMA2/HrMA4*アクチン遺伝子クラスター

*HrMA4*遺伝子を含むゲノムDNAクローンを得る目的で、*MA4-N*を用いて30万クローンをスクリーニングし、11個の陽性クローンを得た。PCR法による3'側非翻訳領域の増幅と増幅断片の塩基配列の比較により、これらの陽性クローンの中から3クローンを選別し、さらに解析を進めた。各クローンの制限酵素地図を作成し塩基配列を部分的に決定したところ、これら3つのクローンは互いに重複しており、これらのクローンに含まれる約30 kbの染色体DNA上には*HrMA4*を含む5個のアクチン遺伝子が並んでクラスターをなすことが明らかになった(図8)。脊椎動物タイプの筋肉アクチン遺伝子が複数個ならんでクラスターをなして存在するという例はこれまでに報告がなく、これが初めてのものである。

クラスターを構成する5個のアクチン遺伝子の向きと位置を調べたところ、5個の遺伝子は1.6 kbから4 kbの間隔を置いて同じ向きに並んでいた(図8)。各遺伝子の3'側の翻訳領域および非翻訳領域の塩基配列を決定し、尾芽胚から得られているアクチンcDNAのものと比較することにより、5個の遺伝子の中にこれらのcDNAに対応する遺伝子が存在するか否かを調べた(図9)。その結果、2つの遺伝子の3'側非翻訳領域の塩基配列が2残基を除いて*HrcMA4*のものと同一であったのでそれぞれ*HrMA4a*、*HrMA4b*と命名した。また、別の1つの遺伝子の3'側非翻訳領域は1残基を除いて*HrcMA2*のものと同一であったので、これを*HrMA2*と名付けた。残りの2個の遺伝子の3'側非翻訳領域の塩基配列は、どのcDNAのものとも異なっており、これらを*HrMA5*および*HrMA6*と名付けた。なお、クラスター内に*HrcMA3*に対応する遺伝子は認められなかった。図9から明らかなように5個の遺伝子の3'側の翻訳領域および非翻訳領域の塩基配列はかなりよく似ており、特に翻訳領域はほとんど同じであった。以後このアクチン遺伝子クラスターを*HrMA2/HrMA4*クラスターと呼ぶ。

*HrMA4a*遺伝子と*HrMA2*遺伝子についてイントロンも含め完全長の塩基配列を決定した(図10)。2つの遺伝子がコードするアミノ酸配列はまったく同じであり、*HrcMA4*によってコードされるアクチンのアミノ酸配列とも同一であった。

*HrMA2*と*HrMA4a*はどちらも2個のイントロンを含んでおり、その位置は両者の間で同じであった。第一イントロンは153番目のコドン内に位置し、その長さは*HrMA2*では81 bp、*HrMA4a*では208 bpであった。第二イントロンは271番目のアミノ酸の位置にあって、*HrMA2*で111 bp、*HrMA4a*で104 bpの長さであった。この2つのイントロンの位置は脊椎動物の α アクチン（筋肉アクチン）遺伝子に存在するイントロンの位置と同じである。ただし、脊椎動物の α アクチン遺伝子にはより多くのイントロンがあり、例えば哺乳類の場合5個から7個のイントロンが存在する。*HrMA2*と*HrMA4a*のイントロン以外の塩基配列は5'側および3'側の非翻訳領域を含め非常によく似ている。これに対して、イントロンの塩基配列にはエキソンとの境界部を除き2つの遺伝子間でかなりの違いがみられた。

*HrMA4a*遺伝子の翻訳開始点付近から上流約600 bpまでの塩基配列を図11Aに示した。転写開始点はプライマー伸長法により決定した（図11B）。転写開始点は予想される翻訳開始コドンの76 bp上流であった。*HrMA4a*遺伝子上流にはいくつかの既知の転写調節配列と同じ配列がみられた。転写開始点の30 bp上流にはTATAボックスと思われる配列が存在する。脊椎動物のアクチン遺伝子上流に共通に存在し、その特異的発現に必要であることが知られるCArGボックス（CC(A/T)₆GG）配列（Minty and Kedes, 1986; Miwa and Kedes, 1987; Phan-Dinh-Tuy *et al.*, 1988; Muscat *et al.*, 1988; Walsh and Schimmel, 1988; Mohun *et al.*, 1989）が1個、-110付近に位置している。さらに、脊椎動物で筋分化を制御する転写因子として知られるMyoDやマイオジェニンなどのbHLHタンパク質の結合部位のコンセンサス配列であるEボックス（CANNTG; Lassar *et al.*, 1989; Davis *et al.*, 1990）が、500 bpほどの領域に7個存在している。E-boxは計算上ランダムな塩基配列にも256塩基対に1個の出現が期待できる配列であるが、*HrMA4a*遺伝子上流にはこれをはるかに上回る数のEボックスがみられる。CArGボックスやEボックスの存在は、*HrMA4a*遺伝子が脊椎動物の筋肉アクチン遺伝子と類似の機構で転写調節を受けている可能性をうかがわせる。

クラスターに存在する*HrMA4a*以外の4個のアクチン遺伝子についても5'側上流領域の塩基配列を決定し比較をおこなった（図12）。5個の遺伝子の5'側上流

領域の塩基配列はよく保存されており、特にTATAボックスやCArGボックス、Eボックスの位置や配列はほぼ同一であった。このことから、これら5個の遺伝子は同様かつ協調的な転写調節を受けている可能性が高いと思われる。

ゲノムDNAクローンの解析から、5個の互いによく似たアクチン遺伝子がマボヤ染色体上でクラスターを形成していることが明らかになった。ところで、これら5個の遺伝子以外にも、別のよく似たアクチン遺伝子が既知のクラスターの近傍、つまり*HrMA5*の下流や*HrMA6*の上流に存在しているであろうか。また、マボヤのゲノム中にはどれくらいの数のアクチン遺伝子が存在しているであろうか。これらの問題を検討するためにMA4-NおよびMA4-Cをプローブとして用いてマボヤゲノムDNAのサザンハイブリダイゼーションをおこなった。MA4-Nをプローブとして緩やかな条件でハイブリダイゼーションをおこなった場合、各レーン2本から4本のバンドが検出された(図13A)。この結果からマボヤのゲノム中には*HrMA4*と類似の3'側非翻訳領域をもつ遺伝子は4個程度であると推測される。クラスターを構成する5個のアクチン遺伝子の3'側非翻訳領域は互いによく似ている(*HrMA4a*の3'側非翻訳領域に対する同一性は82%から100%)ので、図13Aで検出されたバンドはすべて既知の5個の遺伝子に由来するものである可能性が高い。したがって既知の5個の遺伝子以外には*HrMA4*タイプのアクチン遺伝子はほとんどないと思われ、マボヤのゲノム中には*HrMA2/HrMA4*クラスターを構成する遺伝子は既知の5個のみであるか、あるいは近傍に別のよく似たアクチン遺伝子が存在するとしてもせいぜい1個程度と思われる。ただし、3'側非翻訳領域がクラスター内の他の遺伝子のものとはかなり異なるようなアクチン遺伝子が近くに連鎖している可能性は否定できない。また染色体の別の場所(または別の染色体上)に*HrMA2/HrMA4*クラスターと離れて類似の遺伝子が存在する可能性は低いと思われる。*HrMA2/HrMA4*クラスターには*HrcMA3*に対応する遺伝子は無かったが、*HrcMA3*の3'側非翻訳領域の塩基配列は*HrMA2*のものによく似ており、*HrMA2*のalleleであるかも知れない。MA4-Cをプローブとしてハイブリダイゼーションをおこなったところ、*Bam*HIで消化した場合(バンドの数は5本、ただしどのバンドも9 kb以上と長い)を除きどのレーンにも多数(1

0本から13本のバンドが観察された(図13B)。この結果は比較的厳しい条件でハイブリダイゼーションをおこなって得たものであり、マボヤのゲノム中には10個以上のアクチン遺伝子が存在すると思われる。同様の結果は細胞骨格アクチン遺伝子をプローブに用いてエボヤ*Styela clava*でも得られている(Beach and Jeffery, 1990)。

(2) *HrMA1*アクチン遺伝子対

*HrMA1*は*HrMA4*とはかなり異なる塩基配列をもつが、*HrMA4*と同様、幼生期にのみ発現する筋肉型アクチン遺伝子である。*HrMA1*と*HrMA4*の転写調節領域の構造と機能を比較することにより筋肉特異的な転写調節機構のより深い理解が得られることが期待される。そこでMA1-Nを用いてゲノムDNAライブラリーから*HrMA1*遺伝子を含むクローンの単離をおこなった。約30万クローンをスクリーニングした結果、3個の陽性クローンが得られた。これら3個のうち1個は3'側非翻訳領域のみを含むものであったので、以後、翻訳領域および5'側上流領域を含むと思われる2クローンについて解析をおこなった。この2つのクローンの部分的な塩基配列を決定したところ、これらのクローンが同一のアクチン遺伝子を含んでいることが明らかになり、この遺伝子の全長の塩基配列を決定した(図14A)。

このアクチン遺伝子の3'側非翻訳領域の塩基配列は*HrcMA1*のものとまったく同じであり、これを*HrMA1a*と命名した。予想外なことに、*HrMA1a*の上流の塩基配列を解析する過程で、*HrMA1a*の上流にもう1つ別のアクチン遺伝子が反対の向きに存在することが見いだされた。この遺伝子の塩基配列は翻訳領域のみならず5'側非翻訳領域、第一イントロンも含め*HrMA1a*の塩基配列に酷似しており*HrMA1b*と名付けた(図14A, B)。得られているどちらのゲノムDNAクローンにも*HrMA1b*遺伝子の第二エクソンより3'側の部分が含まれていないため、*HrMA1b*の3'側非翻訳領域が*HrcMA1*のものと同じであるかどうかは不明である。なお、2つのゲノムDNAクローンの中には*HrMA1a*、*HrMA1b*両遺伝子以外のアクチン遺伝子は含まれていなかった。MA1-NをプローブとしておこなったマボヤゲノムDNAのサザンハイブリダイゼーシ

ヨンでは各レーンとも1本のバンドが検出され、マボヤのゲノム中には*HrMA1a*と*HrMA1b*以外に*HrMA1*タイプのアクチン遺伝子は存在しないと思われる (data not shown) .

*HrMA1a*はいくつかの点で*HrMA2*や*HrMA4a*といったクラスターに存在するアクチン遺伝子とは異なっている。第一に、*HrMA1a*の3'側および5'側の非翻訳領域の塩基配列は*HrMA4a*のものとはまったく異なる。第二に、*HrMA2*や*HrMA4a*が2個のイントロンをもつのに対して、*HrMA1a*は3個のイントロンをもっている。また第三に、cDNAの項で*HrMA1*に関して述べたことであるが、*HrMA1a*の翻訳領域の塩基配列も*HrMA4a*などとはかなり違うことが挙げられる。*HrMA4a*と*HrMA1a*の塩基配列の同一性は82.2%であり、コドンの使われ方にかかなりの違いがみられる。ただし、予想されるアミノ酸配列を比較した場合、違いは378アミノ酸残基中5個で98.7%が同じであり、*HrMA1a*がコードするアクチンは*HrMA4a*がコードするアクチンとよく似ている。

プライマー伸長法により決定した2つの*HrMA1*遺伝子の転写開始点は、それぞれの遺伝子の翻訳開始コドンの85 bp上流であった。*HrMA1a*と*HrMA1b*の転写開始点はわずか340 bpしか離れていない。それぞれの遺伝子の転写開始点から30 bp上流にはTATAボックスと思われる配列があり、翻訳開始コドンからTATAボックスまでの塩基配列は2つの遺伝子間でよく保存されていた (図15A) . 2個のTATAボックスの間にはEボックス配列が1個存在し、このEボックスの周囲の配列は*HrMA4a*の転写開始点の最も近くに位置するEボックスの周囲の配列にある程度の類似性を示す (図15A, C) . 2つの*HrMA1*遺伝子に共有されたプロモーター領域には他にCARGボックスに類似の配列がほぼ対称な位置に並んでおり (図15A, C) , さらに中央部分には脊椎動物の筋肉特異的遺伝子の転写調節領域に存在するMEF-2部位

(Cserjesi and Olson, 1991; Edmondson *et al.*, 1992)に似たA/Tに富む配列がみられた (図15A) . *HrMA1*遺伝子対のように2つの遺伝子が隣接した転写開始点から互いに逆向きに転写される例はいろいろな生物で知られている (Iatrou and Tsitilou, 1983; Burbelo *et al.*, 1988; Logan *et al.*, 1989; Hofmann *et al.*, 1991; Salzberg *et al.*, 1993) . 多く

の場合こうした遺伝子対をなす2つの遺伝子に共有されるプロモーター領域には両方の遺伝子の転写を同時に制御する調節配列があり、bidirectional promoterとして機能している。2つの*HrMA1*遺伝子には含まれた340 bpの上流領域にも両方の遺伝子の筋肉特異的転写を同時に制御する調節配列が存在しているかも知れない。

4. 顕微注入法によるアクチン遺伝子プロモーターの機能解析

上述の7個のアクチン遺伝子はいずれも幼生の筋肉細胞で特異的に発現する遺伝子であると思われる。特に、*HrMA4*に関しては、3'側非翻訳領域をプローブに用いて、胚の筋分化にともなって囊胚期から筋肉系統の細胞で転写されることが示された。これらのアクチン遺伝子の筋肉特異的な転写調節に関わるシス調節配列を明らかにする目的で、各々の遺伝子上流領域にレポーター遺伝子として大腸菌の β ガラクトシダーゼ遺伝子 (*lac-Z*) を接続した融合遺伝子を作製した (図16)。これらの融合遺伝子のうち*HrMA4a*の上流領域を*lac-Z*に接続したものと、*HrMA1a*の上流領域を*lac-Z*に接続したものについては、受精卵に顕微注入することにより上流領域の機能解析をおこなった。以下にこれらの結果について述べる。

(1) *HrMA4a-lacZ*融合遺伝子の発現

*HrMA4a*の転写開始点の下流10 bpから上流1.4 kbまでのDNA断片を*lac-Z*遺伝子に接続したプラスミドp*HrMA4a-Z*、およびこの上流断片を5'側から削ってさらに短くしたいくつかのプラスミドを作製した (図16)。これらをマボヤの受精卵に顕微注入し、発生させた後に、 β ガラクトシダーゼ活性を組織化学的に染色することによって融合遺伝子産物の発現を調べた。その結果をまとめたものが表2である。

p*HrMA4a-Z*、転写開始点上流216 bpまでを含む融合遺伝子p*HrMA4a-Z*(Δ 216)、上流103 bpまでを含むp*HrMA4a-Z*(Δ 103)を注入した場合、多くの胚で β ガラクトシダーゼ活性が検出され、そのほとんどで筋肉細胞のみに染色がみられた (表2, 図17A, C, D)。一部の胚では筋肉細胞に加え表皮細胞での発現が観察されたが (図

17B), 表皮細胞のみに酵素活性が検出された例はわずかであった(表2)。なお表皮と筋肉以外の組織では発現はみられなかった。染まっている細胞の数は胚によってさまざまであり, 第一次筋肉系統, 第二次筋肉系統のどちらにも発現がみられた(図17D)。一方, 転写開始点の上流61 bpまでを含む融合遺伝子pHrMA4a-Z(Δ 61)を注入した場合には, 一部の胚で表皮に β ガラクトシダーゼ活性が検出されたが筋肉細胞ではまったく染色はみられなかった(表2, 図17E, F)。図16に示したとおりpHrMA4a-Z(Δ 103)にはTATAボックスとEボックスが1個含まれるがCArGボックスやより上流のEボックスは含まれていない。このことは, 筋肉細胞での転写にはTATAボックスと1個のEボックスを含む-103までの領域があれば十分であることを示している。また-61まで削った場合には筋肉での発現がまったくみられなくなったことから, -61付近から-103までの部分に筋肉細胞特異的な転写活性化に必要な調節配列が存在すると思われる。-103より上流の領域がなくても筋肉細胞での発現は十分起こるようであるが, この領域に存在する配列がより強い発現を得るのに必要であるという可能性も考えられる。

(2) *HrMA1a-lacZ*融合遺伝子の発現

*HrMA1a*の翻訳開始コドンのすぐ上流から転写開始点の1050 bp上流までの約1.1 kbのDNA断片を*lac-Z*遺伝子に接続した融合遺伝子pHrMA1a-Zを作製した。これをpHrMA4a-Zと同様にマボヤの受精卵に注入して発生させた後, β ガラクトシダーゼ活性の発現を調べた。表3に示したように, 2×10^5 コピーのpHrMA1a-Zを注入した場合, 6割の胚で*lac-Z*の発現が検出され, そのほとんどで筋肉細胞のみに染色がみられた。また, 1×10^5 コピーのpHrMA1a-Zを注入した場合には*lac-Z*を発現する胚の割合は減少したが, 発現が観察された胚ではその発現は筋肉に限られていた。図18は*lac-Z*を発現した胚の例である。pHrMA4a-Zを注入した場合と同様, 染まっている細胞の数は胚によってさまざまであった。また, 第一次筋肉系統, 第二次筋肉系統のどちらにも発現がみられた(図18B)。これらの結果から, *HrMA1a*の上流の, 転写開始点から1050 bpまでの領域に筋肉特異的な遺伝子発現に必要な調節配列が含ま

れていると考えられる。

5. 筋肉特異的な転写調節に関わるタンパク質因子の検索

融合遺伝子を顕微注入する実験から*HrMA4a*の筋肉特異的発現に必要な上流領域をある程度特定することができた。また*HrMA4a*や*HrMA1*の上流領域には脊椎動物の筋肉特異的遺伝子発現に関わる転写因子の結合部位のコンセンサス配列またはそれに似た配列が存在している。*HrMA4a*の上流領域に結合し、筋肉特異的な転写の活性化に関与するタンパク質因子を探す目的で、2本鎖オリゴDNAを用いたゲルシフトアッセイをおこなった。

*HrMA4a*遺伝子上流の-54から-192までの領域の配列に対応する30 bp前後の長さの2本鎖オリゴヌクレオチドを6種類(A, B, C, D, E, F)合成した(図19A,B)。オリゴヌクレオチドA, B, Fはそれぞれ2個, 1個, 1個のEボックスを含み、オリゴヌクレオチドDはCArGボックスを含んでいる。融合遺伝子の顕微注入実験の結果から筋肉特異的な正の調節配列の存在が予想される-62から-103の領域はオリゴヌクレオチドEとFに含まれている。放射性標識したこれらのオリゴヌクレオチドを、マボヤ神経胚から調製した核抽出液とインキュベートした後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動をおこない、オートラジオグラフィーにより核タンパク質のオリゴヌクレオチドへの結合を検出した。その結果、オリゴヌクレオチドFにはっきりとしたタンパク質の結合が2本のバンドとして検出された(図20A, 矢じり)。これらのバンドは100倍量の非放射性オリゴヌクレオチドFの添加により消失したが、他の非放射性オリゴヌクレオチドを100倍量添加してもほとんど変化がなかった(図20B, レーン1~7)。2本のバンドのうち下の方のバンドはポリdA:dT 2本鎖を200倍量加えることによってほぼ完全に失われた(図20B, レーン12~14)。このことから、このバンドで検出されたタンパク質はアデニンまたはチミンが並んだ配列を認識して結合するものであると考えられる。実際、オリゴヌクレオチドFには3'末端にチミンが6個ならんだ配列(相補鎖ではアデニン)があり(図19B)、この

部分を削るとこの結合が失われる (data not shown) . オリゴヌクレオチドDをプローブに用いた場合にもFと同じような2本のバンドがごく弱く検出された。しかし、100倍量の非放射性オリゴヌクレオチドDを加えてもオリゴヌクレオチドFのバンドは失われず、Dで検出されたバンドが同じ核タンパク質の結合によるものであるとしても、そのDに対する結合親和性はFに対する場合と比較してかなり低いようである(図20B) . また、オリゴヌクレオチドA, B, Cをプローブに用いた場合には、オリゴヌクレオチドFで検出された2本のバンドのうち上の方のバンドと同じような移動度のバンドがかすかに検出されたが(図20A) , 非常に多量(放射性プローブの1000倍量)の非放射性オリゴヌクレオチドA, B, Cを加えてもFのバンドのシフトは失われず、また大量の非放射性Fを加えてもA, B, Cのバンドは失われないので、A, B, Cで検出されたバンドはFに結合しているタンパク質とは別の核タンパク質によるものと思われる (data not shown) . これらの結果から、オリゴヌクレオチドFで検出されたタンパク質の結合はかなり特異性の高いものであるといえる。オリゴヌクレオチドFは*HrMA4a-lacZ*融合遺伝子の顕微注入実験によって筋肉特異的転写調節配列の存在が示された領域内に対応することから、ここで検出された核タンパク質が*HrMA4a*遺伝子の特異的発現の制御に何らかの関連がある因子であることが期待される。オリゴヌクレオチドFには上で述べた2本のバンド以外に移動度の異なる1本のバンドが見られた(図20A, 矢印)が、このバンドはオリゴヌクレオチドA, B, C, Dをプローブに用いた場合にもみられ、1000倍量のA, B, C, Dを加えることによって失われた (data not shown) . したがって、このバンドで検出された核タンパク質の結合のFに対する特異性は低いようである。

オリゴヌクレオチドFはEボックスを1個含んでいるが、Eボックスを含む別のオリゴヌクレオチドAやBはオリゴヌクレオチドFで検出された特異的核タンパク質の結合を阻害しない。検出されたバンドのシフトがオリゴヌクレオチドFのどのような配列を認識して結合したものであるかを、Fにさまざまな変異を入れたオリゴヌクレオチドを用いた競合実験によって調べた。図19Bに示した4種類の2本鎖オリゴヌクレオチド($\mu 1, \mu 2, \mu 3, \mu 4$)を合成し、放射性標識したオリゴヌクレオチドFと

の競合実験をおこなった（図 2 0 B）．その結果Eボックスを含む部分（AACAACT-GTC）を μ 1: AACAcTGTC, μ 2: AAgAACTGTC, μ 4: AtggtCctgaに置換した場合には競合しなくなったのに対し, μ 3:AACAACTtTCは強い競合活性を示した（置換した塩基対を小文字で表した）．これらの結果から, Fで検出されたタンパク質の結合には必ずしもCANNTGというEボックス配列が必要というわけではないが, Eボックス付近の何らかの配列を特異的に認識しているものと思われる．

1. 幼生型筋肉アクチン遺伝子の発現様式

*HrMA4*の非翻訳領域をプローブに用いておこなったノーザンブロット解析によると、*HrMA4*のmRNAは卵母細胞、受精卵および卵割期の胚では検出されず、初期囊胚期に初めて現れる。mRNAの量は以後しだいに増加し、尾芽胚期に最大となるが、変態後検出されなくなり、成体では心筋や体壁筋も含めどの組織にも発現はみられなかった。また、*in situ*ハイブリダイゼーションの結果によると、*HrMA4*の発現は筋肉細胞でのみみられた。また*HrMA1*特異的プローブを用いたノーザンブロット解析やp*HrMA1a-Z*の顕微注入実験の結果から、*HrMA1*遺伝子も*HrMA4*とまったく同じように発現するといえる。

*HrMA4*と*HrMA1*の転写は初期囊胚期に開始するようであるが、ホヤにおいて囊胚期に転写が開始する遺伝子の例は他にもいくつか知られている。シロボヤ*Styela plicata*では体壁筋由来アクチンcDNAを用いた研究により、やはり筋肉アクチンmRNAが初期囊胚期に筋肉系統の割球で現れることが示されている (Tomlinson *et al.*, 1987)。また、カタユウレイボヤ*Ciona intestinalis*のアセチルコリンエステラーゼのmRNAが囊胚期から出現することがアフリカツメガエル卵に胚から抽出したRNAを注入することにより示されている (Meedel and Whittaker, 1983)。さらにマボヤのミオシン重鎖遺伝子の転写産物も囊胚期に初めて検出されるようになる (Makabe *et al.*, 1990)。ホヤにおいて初期囊胚期は組織特異的な酵素や構造タンパク質の遺伝子が初めて活性化される遷移期であるのかもしれない。ただし、上に挙げた例はいずれも筋肉特異的遺伝子の例であり、現時点では他の組織特異的遺伝子についての報告がほとんど無いので、これが一般的にいろいろな組織についていえるかどうかはいまのところ結論づけることはできない。

ホヤで囊胚期以前にzygoticに転写される遺伝子の例が最近相次いで報告された。マボヤからマウスの*T*遺伝子 (*Brachyury*) ホモログが単離され、その発現様式が調べられたが、この遺伝子のmRNAは予定脊索細胞で64細胞期から検出される

(Yasuo and Satoh, 1993a) . また、マボヤのMyoD遺伝子の転写産物もRT-PCR法によってやはり64細胞期からの発現が検出されている (Araki *et al.*, 1993) . MyoDは脊椎動物で筋肉特異的な転写調節因子として知られており、*Brachyury*産物もDNA結合タンパク質で転写調節因子としての役割が予想されている (Kispert and Herrmann, 1993) . このように転写調節因子をコードする遺伝子のzygoticな発現は既に64細胞期には始まっているようである。これらの遺伝子の産物が囊胚期に組織特異的遺伝子の活性化をおこなうのかもしれない。これを筋肉細胞分化について考えた場合、卵細胞質因子を起点とする次のような細胞分化の経路を想定することができる。第一次筋肉系統の細胞では、卵の筋肉細胞質（マイオプラズム）に存在する筋分化決定因子が卵割に伴って正確に筋肉系統の割球に分配される。この決定因子が直接あるいは間接に64細胞期頃に少数の転写調節因子をコードする遺伝子の発現を誘導する。これらの転写調節因子が囊胚期にアクチンやミオシンなど多数の筋特異的タンパク質の遺伝子を活性化する。本研究によると第一次系統と第二次系統のどちらでも同じアクチン遺伝子が発現しているようであり、また*HrMA4a*のかなり短い上流領域が両方の筋肉系統の細胞における転写を導くことが出来るようである。したがって、少なくともアクチン遺伝子については、第二次系統の筋肉細胞においても第一次系統と同じ転写因子群が筋肉特異的な転写の活性化に働いている可能性が高いと思われる。

本研究では母性の筋肉アクチンmRNAは検出されなかったが、Tomlinson *et al.* (1987)はシロボヤ卵には筋肉アクチンmRNAがわずかに存在すると報告している。しかし、彼らが用いたプローブは成体の体壁筋のcDNAライブラリーから単離した筋肉アクチンcDNAに由来するものであり、マボヤの成体の体壁筋や心筋では*HrMA4*や*HrMA1*とは異なるアクチン遺伝子が発現していることが本研究で示されているので、Tomlinsonらが検出した母性の筋肉アクチンmRNAは幼生で発現しているアクチン遺伝子とは異なるものである可能性がある。

2. 幼生型筋肉アクチン遺伝子の genomic organization

*HrMA4*を含む5個の筋肉アクチン遺伝子が同じ向きに並んでクラスター(*HrMA2/HrMA4*クラスター)を形成していること、*HrMA1a*, *HrMA1b*という2個のよく似た筋肉アクチン遺伝子が逆向きに並んで遺伝子対(*HrMA1*遺伝子対)を形成していることが本研究から明らかになった。アクチン遺伝子が染色体上でクラスターをなしている例はウニや線虫などでも知られているが(Davidson *et al.*, 1985; Krause *et al.*, 1989), 多くの生物ではアクチン遺伝子はゲノム中に散在しており, 特に脊椎動物型の筋肉アクチン遺伝子のクラスターとしてはマボヤの*HrMA2/HrMA4*クラスターが初めての報告である。*HrMA2/HrMA4*クラスターに含まれる5個の遺伝子の塩基配列は極めてよく保存されている。このことから, このクラスターは比較的最近の遺伝子重複によって生じたものと推定される。しかし, 別の可能性としてかなり古い時代にクラスターを構成する遺伝子の重複は起こったが遺伝子変換(gene conversion)によって高い類似性が保持されてきたということも考えられる。クラスター内のアクチン遺伝子がすべて実際に転写されているかどうか, あるいは発現様式は同じかどうかについてはまだ確認されていない。しかし, イントロン以外の塩基配列が上流領域も含め遺伝子間でよく保存されていることから, クラスター内の5個のアクチン遺伝子はどれも転写され機能している可能性が高いと思われる。またプロモーター領域の高い類似性はどの遺伝子も同様な発現制御を受けていることをうかがわせる。cDNAの翻訳領域をプローブとして用いた解析の結果から, 少なくとも発現している遺伝子については幼生の筋肉に特異的であるといえるであろう。幼生型筋肉アクチン遺伝子がクラスターを形成していることは, 極めて短時間に完了するホヤ胚の筋肉形成過程で大量に必要とされるアクチン分子を供給するのに役だっているのではないかと考えられるが, これについては後でもう一度議論する。

*HrMA1*遺伝子対にみられる遺伝子の配置も他の生物のアクチン遺伝子では知られていないものである。しかしアクチン以外の遺伝子について, 2つの遺伝子が隣接した転写開始点から互いに逆向きに転写される例は昆虫や哺乳類をはじめとするいろいろな生物で知られている(Iatrou and Tsitilou, 1983; Kelmer and Busslinger,

1986; Burbelo *et al.*, 1988; Logan *et al.*, 1989; Hofmann *et al.*, 1991; Salzberg *et al.*, 1993) . 多くの場合こうした遺伝子対をなす2つの遺伝子は時間的・空間的に同一の発現パターンを示す. 遺伝子対の2つの転写開始点にはさまれ両遺伝子に共有される5'上流領域には両方の遺伝子の転写に必要な調節配列が含まれ, 両方向への転写を同時に制御するbidirectional promoterとして機能しているようである (Burbelo *et al.*, 1988; Logan *et al.*, 1989; Salzberg *et al.*, 1993) . *HrMA1a*と*HrMA1b*は340 bp離れた転写開始点から互いに反対方向に転写される. 現時点では*HrMA1b*遺伝子の発現は証明されていないが, 2つの遺伝子の塩基配列がほぼ同じであること, TATAボックスや転写開始点付近の配列が保存されているのに対してその前後の配列の保存度が低いことから両方向への転写が機能していると思われる. これまで知られている他の遺伝子対のbidirectional promoterのように, 2つの遺伝子に共有される340 bpの上流領域には両方向への筋肉特異的な転写を同時に調節するシス調節配列が存在するかも知れない. もしそうであるならば, *HrMA1*遺伝子対は筋特異的転写調節因子の効率的な利用に役だっていると考えられることもできる.

今後, *HrMA2/HrMA4*クラスターと*HrMA1*遺伝子対に含まれる7個の遺伝子それぞれの発現の有無と発現様式を明らかにすることが重要であると思われる. 「結果」で述べたように, 既に7個の遺伝子それぞれの上流領域に*lacZ*遺伝子を接続した融合遺伝子を作製している (図13) . 顕微注入法により胚に導入したこれらの融合遺伝子の発現を調べることにより, 各遺伝子が転写されているかどうか, 発現している場合どこで発現しているか, が明らかにできるものと期待している.

クラスターおよび遺伝子対がいつどのようにして形成されてきたのかという問題は遺伝子およびゲノム構造の進化という側面から見て興味深いと思われる. 今後, マボヤ以外のいろいろなホヤおよびサルパやナメクジウオなど他の原索動物のアクチン遺伝子を調べることでこの点に関する情報が得られるであろう. また, クラスターや遺伝子対が尾索類の中でどれほど普遍的なものであるかという問題は, 次に議論する「なぜ複数のアクチン遺伝子が幼生の筋肉で発現しているのか」という問題と深く関連があり, 興味をもたれる.

3. なぜ複数のアクチン遺伝子が幼生の筋肉で発現しているのか

本研究を通じて7個の筋肉アクチン遺伝子が単離・同定された。これらの中には偽遺伝子が含まれている可能性もあるが、その多くは胚から幼生にかけて筋肉細胞で同時に発現していると思われる。またエボヤ*Styela clava*の幼生でも同じアミノ酸配列をコードする複数の筋肉アクチン遺伝子が発現していることが知られている (Beach and Jeffery, 1992)。一方、ホヤ以外の多くの動物でも複数の筋肉アクチン遺伝子が存在しているが、ほとんどの場合、各遺伝子はそれぞれ異なる筋肉アクチンアイソフォームをコードしており、異なった発現様式を示す。例えば、哺乳類では4個の異なる筋肉アクチン遺伝子があり、それぞれが異なるアイソフォーム（骨格筋 α 、心筋 α 、平滑筋 α と γ ）をコードしている (Vandekerckhove and Weber, 1979)。骨格筋アクチンと心筋アクチンは発生過程において同じ組織にも発現がみられるが、各々に特徴的な時間的発現様式を示し、発現量も異なる (Sassoon *et al.*, 1988; Lyons *et al.*, 1991; Cox and Buckingham, 1992)。また、ショウジョウバエでもいくつかの筋肉アクチン遺伝子が知られているが、これらはそれぞれ時間的あるいは空間的に異なる発現様式を示す (Mahaffey *et al.*, 1985; Hiromi and Hotta, 1985; Courchesne-Smith and Tobin, 1989)。ホヤのように多数の筋肉アクチン遺伝子がまったくあるいはほとんど同じアミノ酸配列のアクチンをコードして、それらが同じ場所で同時に発現するという例は他に知られていない。

複数のアクチン遺伝子がホヤ胚の筋肉で発現していることの1つの説明として、ホヤの幼生筋の分化開始から機能的な筋肉が出来上がるまでの時間の短さがある (Beach and Jeffery, 1992)。比較的低温で発生する種類であるマボヤの場合、筋肉特異的遺伝子群の転写が始まる囊胚期から孵化して泳ぎ始めるまでの時間は約20時間 (15℃) である (Satoh, 1979)。より高い温度で発生するホヤではその時間はもっと短く、例えばナツメボヤ*Ascidia ahodori*では約6時間 (25℃) である (石川・沼宮内, 1988)。一方、脊椎動物の中では比較的発生の速いアフリカツメガエルでも、 α 心筋アクチン遺伝子の転写が始まる後期囊胚期 (St. 12) から胚がわずかに動き始める (St. 26) までの時間は24℃で約17時間であり (Nieuwkoop and Faber,

1967; Hopwood *et al.*, 1989), より低温 (18℃) で発生するヒキガエルやイモリではそれよりもはるかに長い時間 (それぞれ2日, 4日) がかかる (梶島・江口, 1989; 市川・田原, 1989). これらを単純に比較することは難しいが, ホヤ胚の筋肉形成は脊椎動物などと比較してかなり短期間でおこるといえるであろう. さらに, アクチンは筋繊維を構成するタンパク質のなかで最も多量に存在する (脊椎動物の骨格筋筋原繊維中のアクチンと各ミオシンサブユニットのモル比は約3:1) ことを考えると, ホヤの胚発生過程で膨大な量のアクチンが速やかに合成される必要があると思われる. 複数のアクチン遺伝子が胚の筋肉で同時に発現することにより, 極めて短期間に多量のアクチンタンパク質の供給が可能になっているのかも知れない.

HrMA2/HrMA4 クラスターや *HrMA1* 遺伝子対はこうした要求を満たす機構として生じてきたとも考えることができる. 尾索類で一般に複数の幼生型筋肉アクチン遺伝子が存在することが示されれば, この考えが支持されるであろう. 他種のホヤにおける筋肉アクチン遺伝子の数, 構造および配置, 特に, クラスターや遺伝子対の有無に興味をもたれる.

マウスやニワトリでも胚の筋肉では α 心筋アクチンと α 骨格筋アクチンの両方が発現している (Hayward and Schwartz, 1986; Sassoon *et al.*, 1988; Lyons *et al.*, 1991). さらにアフリカツメガエルでは3種類の横紋筋型 α アクチン遺伝子 (心筋型, 骨格筋型, 大腿筋型) が胚の筋肉で発現している (Mohun and Garrett, 1988). これらのアクチン遺伝子は成体ではそれぞれ別の組織で発現しているものである. ホヤで知られているほど多数の遺伝子ではないが, 脊椎動物でも複数の筋肉アクチン遺伝子が胚の筋肉では同時に発現しているようであり興味深い.

4. 筋肉特異的転写に関わる調節配列と転写調節因子

融合遺伝子を胚に導入する実験から, *HrMA4a* 遺伝子の転写開始点から上流103 bpの部分までで筋肉特異的な発現には十分であるが, 転写開始点から上流61 bpまでの領域では筋肉での発現がみられなくなることが明らかになった. このことから-61付近から-103の間に筋特異的な転写に必要な調節配列が存在していると思わ

れる。この領域にはEボックスが1個含まれているが、より上流に位置するCArGボックスや数個のEボックスは含まれていない。しかし、この結果は-103より上流にあるCArGボックスやEボックスあるいはその他の配列の筋特異的転写における役割を否定するものではない。-61付近から-103の間にある調節配列と同じ機能をもった配列が-103より上流にも存在することも考えられるし、転写レベルをより増強する筋肉特異的エンハンサーがあるかも知れない。ゲルシフトアッセイによると、転写開始点の最も近くに位置するEボックスの付近に核タンパク質が特異的に結合する。このEボックス配列CAACTGをCAcaTGやgAACTG（置換した塩基対を小文字で表した）に変えるとタンパク質の結合が失われたが、CAACTiに変えても結合能は保たれていた。したがってこの核タンパク質の結合には必ずしも完全なEボックス配列CANNTGが必要というわけではないようである。いずれにしても、ここで検出された核タンパク質は*HrMA4a*遺伝子の筋肉特異的転写を調節する転写因子の候補の1つである。今後、この核タンパク質の結合と筋肉特異的な遺伝子発現の関係を、ゲルシフト法で用いたのと同じ変異を導入した融合遺伝子を胚に顕微注入することによって明らかにしたい。また、*HrMA2/HrMA4*クラスターに含まれる遺伝子の活性化を同時に制御する領域（locus activating region）がクラスターの外部または内部に存在していることも考えられる。

*HrMA1*遺伝子対に関しては現在までのところ*HrMA1a*の転写開始点から上流約1.0 kbまでの領域があれば筋肉特異的な発現が起こることが分っている。この1.0 kbの領域のうち上流側の約700 bpは*HrMA1b*遺伝子として転写される部分であるので、転写調節に必要なシス調節配列はすべて2つの遺伝子には含まれた340 bpの領域に含まれている可能性が十分に考えられる。この340 bpの領域には、それぞれの転写開始点から30 bpのところまったく同じTATAボックスがあり、2個のTATAボックスの間には1個のEボックスと2個のCArGボックス類似配列および1個のMEF-2部位に似た配列がある。今後、より短い上流領域を含んだ融合遺伝子や上流領域に変異を導入した融合遺伝子を用いて2つの*HrMA1*遺伝子の筋肉特異的発現に必要な調節配列を調べる必要がある。*HrMA1*遺伝子対と*HrMA2/HrMA4*クラスターのプロモーター

の構造と機能を比較しながら解析することによって、筋特異的な転写調節に関するより詳しい情報が得られるであろう。

*HrMA4*や*HrMA1*の上流にはEボックス、CArGボックス、MEF-2結合部位に似た配列がみられる。さらにこれらの上流領域の特徴としてA/Tに富む配列が非常に多いことが挙げられる。したがって、MyoDやマイオジェニンなどmyogenic bHLHタンパク質の相同分子やMEF-2因子 (Edmondson *et al.*, 1992; Yu *et al.*, 1992) の相同分子、脊椎動物で筋肉に発現しA/Tに富む配列に結合することが知られるM-Hox (Cserjesi *et al.*, 1992) の相同分子が*HrMA4*や*HrMA1*の筋肉特異的な転写に関与している可能性がある。最近マボヤのMyoD相同分子が単離され、初期胚で発現していることが報告された (Araki *et al.*, 1993)。この分子と筋肉アクチン遺伝子の転写調節との関わりを明らかにすることも今後の課題である。

5. ホヤにおける筋肉アクチン遺伝子ファミリー

*HrMA2/HrMA4*クラスターと*HrMA1*遺伝子対に含まれるアクチン遺伝子はいずれも幼生の筋肉でのみ発現するものであった。これらの遺伝子がコードするアクチンのアミノ酸配列は互いに非常によく似ている。また、エボヤで単離された尾芽胚の筋肉アクチンcDNAがコードするアミノ酸配列も*HrMA1*や*HrMA4*のものとよく似ている (Beach and Jeffery, 1992)。これに対し、シロボヤやモルグラ属のホヤの1種 *Molgula citrina* で体壁筋cDNAライブラリーから単離された筋肉アクチンcDNAがコードするアミノ酸配列は*HrMA1*や*HrMA4*のものとはかなり異なっている (Tomlinson *et al.*, 1987; Kovilur *et al.* 1993)。したがって、ホヤの筋肉アクチンには少なくとも2つの明らかに異なるアイソフォームがあり、一方が幼生の筋肉で主に発現し、もう一方は成体の体壁筋で発現しているようである。Kovilur *et al.* (1993)は、アミノ酸配列の比較から、ホヤの幼生筋アクチンは脊椎動物の心筋アクチンに、体壁筋アクチンは脊椎動物の骨格筋アクチンにより似ていると結論している。しかし彼らは357番目のアミノ酸残基がセリン (ホヤ幼生筋、脊椎動物骨格筋) であるかスレオニン (ホヤ体壁筋、脊椎動物心筋) であるかだけを根拠としてこの結論を得ており、十

分な説得力をもつとはいいいない。事実、HrMA1アクチンは明らかに幼生筋で発現する他のアクチン（HrMA4アクチンやエボヤ幼生型アクチン）に似たアミノ酸配列をもつが、357番目のアミノ酸残基は脊椎動物の骨格筋と同じスレオニンである。ホヤの筋肉アクチンが脊椎動物の筋肉アクチンによく似たアミノ酸配列をもつことは確かであるが、現時点では、ホヤの各々のアクチンアイソフォームと脊椎動物のアクチンアイソフォームとの対応関係を示すのは難しい。

翻訳領域プローブを用いた成体各組織のノーザンブロット解析は、体壁筋と心筋で異なるアクチン遺伝子が発現している可能性を示している。これまでのところホヤの心筋で発現するアクチン遺伝子に関する報告はほとんどない。心筋のcDNAライブラリーを作製し、筋肉アクチンcDNAを単離してその塩基配列および発現様式を調べることでこの点が明らかにできると思われる。こうした解析を通して、発生過程におけるホヤの各筋肉組織の起源や、ホヤの3種類の筋肉と脊椎動物の筋肉との関係といった問題にもせまり得るであろう。

謝 辞

本研究をおこなうにあたり、いろいろな面で協力してくださった以下の方々に厚くお礼申し上げます。

分子生物学の技術と実験の心構えを指導してくださった真壁和裕博士に感謝いたします。共同研究者であり、融合遺伝子の顕微注入をおこなってくださった彦坂暁氏に感謝いたします。ゲルシフトアッセイの実験条件の検討とそれを用いたDNA結合タンパク質の解析に協力してくださった佐藤ゆたか氏、HrMA4遺伝子のノーザンブロット解析の結果を提供してくださった東京都立大学の西駕秀俊助教授に感謝いたします。超遠心機などの使用を快く許してくださった生物物理学教室の竹市雅俊教授をはじめとする竹市研究室の皆様に感謝いたします。また、マボヤの採集にあたり便宜をはかってくださった東北大学理学部附属臨海実験所の皆様、東京大学海洋研究所附属大槌臨海研究センターの皆様に感謝いたします。研究内容について議論してくださり、さらに英語論文執筆についての助言をくださったWilliam R. Jeffery博士に感謝いたします。

そして、本研究をおこなうに際し、研究内容について熱心に議論してくださった動物学教室分子発生研の皆様と分子発生研および発生研出身者の皆様にお礼申し上げます。最後に、指導教官として、また共同研究者として、適切なご指導、ご助言と不断の暖かい励ましをいただき、さらに、本稿の精読と批評もしてくださった佐藤矩行助教授に心から感謝いたします。

文献

- Araki, I., Saiga, H., Makabe, K. W. and Satoh, N. (1993) Expression of AMD1, a gene for a MyoD1-related factor in the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Roux's Arch. Dev. Biol.* in press.
- Beach, R. L. and Jeffery, W. R. (1990) Temporal and spatial expression of a cytoskeletal actin gene in the ascidian *Styela clava*. *Dev. Genet.* **11**, 2-14.
- Beach, R. L. and Jeffery, W. R. (1992) Multiple actin genes encoding the same α -muscle isoform are expressed during ascidian development. *Dev. Biol.* **151**, 55-66.
- Burbelo, P. D., Martin, G. R. and Yamada, Y. (1988) $\alpha 1(\text{IV})$ and $\alpha 2(\text{IV})$ collagen genes are regulated by a bidirectional promoter and a shared enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 9679-9682.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- Conklin, E. G. (1905) The organization and cell lineage of the ascidian egg. *J. Acad. Natl. Sci. Philadelphia* **13**, 1-119.
- Courchesne-Smith, C. L. and Tobin, S. L. (1989) Tissue-specific expression of the 79B actin gene during *Drosophila* development. *Dev. Biol.* **133**, 313-321.
- Cox, R. D. and Buckingham, M. E. (1992) Actin and myosin genes are transcriptionally regulated during mouse skeletal muscle development. *Dev. Biol.* **149**, 228-234.
- Cserjesi, P. and Olson, E. N. (1991) Myogenin induces the myocyte-specific enhancer binding factor MEF-2 independently of other muscle-specific gene products. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 4854-4862.
- Cserjesi, P., Lilly, B., Bryson, L., Wang, Y., Sassoon, D. A. and Olson, E. N. (1992) MHox: a mesodermally restricted homeodomain protein that binds an essential site in the muscle creatine kinase enhancer. *Development* **115**, 1087-1101.

- Davidson, E. H. (1986) *Gene Activity in Early Development*, Third Edition. Orlando, Florida: Academic Press.
- Davidson, E. H. (1993) Later embryogenesis: regulatory circuitry in morphogenetic fields. *Development* **118**, 665-690.
- Davidson, E. H., Flytzanis, C. N., Lee, J. J., Robinson, J. J., Rose III, S. J. and Sucov, H. M. (1985) Lineage-specific gene expression in the sea urchin embryo. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **50**, 321-328.
- Davis, R. L., Cheng, P.-F., Lassar, A. B. and Weintraub, H. (1990) The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. *Cell*, **60**, 733-746.
- Denhardt, D. T. (1966) A membrane-filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **23**, 641-646.
- Edmondson, D. G., Cheng, T.-C., Cserjesi, P., Chakraborty, T. and Olson, E. N. (1992) Analysis of the myogenin promoter reveals an indirect pathway for positive autoregulation mediated by the muscle-specific enhancer factor MEF-2. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 3665-3677.
- Hayward, L. J. and Schwartz, R. J. (1986) Sequential expression of chicken actin genes during myogenesis. *J. Cell Biol.* **102**, 1485-1493.
- Hikosaka, A., Kusakabe, T., Satoh, N. and Makabe, K. W. (1992) Introduction and expression of recombinant genes in ascidian embryos. *Dev. Growth Differ.* **34**, 627-634.
- Hofmann, A., Garfinkel, M. D. and Meyerowitz, E. M. (1991) cis-Acting sequences required for expression of the divergently transcribed *Drosophila melanogaster* *Sgs-7* and *Sgs-8* glue protein genes. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 2971-2979.
- Hiromi, Y. and Hotta, Y. (1985) Actin gene mutations in *Drosophila*; heat shock activation in the indirect flight muscles. *EMBO J.* **4**, 1681-1687.

- Hopwood, N. D., Pluck, A. and Gurdon, J. B. (1989) MyoD expression in the forming somites is an early response to mesoderm induction in *Xenopus* embryos. *EMBO J.* **8**, 3409-3417.
- Iatrou, K. and Tsitilou, S. G. (1983) Coordinately expressed chorion genes of *Bombyx mori*: is developmental specificity determined by secondary structure recognition? *EMBO J.* **2**, 1431-1440.
- 石川優・沼宮内隆晴 (1988) 原索動物尾索類 (1) 単体ボヤ, "海産無脊椎動物の発生実験" 石川優・沼宮内隆晴共編, pp. 182-196. 培風館.
- 市川衛・田原胖 (1989) ヒキガエルの発生段階表, "脊椎動物の発生 (上)" 岡田節人編, pp. 357-373. 培風館.
- Jeffery, W. R., Tomlinson, C. R. and Brodeur, R. D. (1983) Localization of actin messenger RNA during early ascidian development. *Dev. Biol.*, **99**, 408-417.
- 梶島孝雄・江口吾朗 (1989) イモリの発生段階表, "脊椎動物の発生 (上)" 岡田節人編, pp. 333-355. 培風館.
- Kemler, I. and Busslinger, M. (1986) Characterization of two nonallelic pairs of late histone H2A and H2B genes of the sea urchin: differential regulation in the embryo and tissue specific expression in the adult. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 3746-3754.
- Kispert, A. and Herrmann, B. G. (1993) The *Brachyury* gene encodes a novel DNA binding protein. *EMBO J.* **12**, 3211-3220.
- Kovilur, S., Jacobson, J. W., Beach, R. L., Jeffery, W. R. and Tomlinson, C. R. (1993) Evolution of the chordate muscle actin gene. *J. Mol. Evol.* **36**, 361-368.
- Krause, M., Wild, M., Rosenzweig, B. and Hirsh, D. (1989) Wild-type and mutant actin genes in *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* **208**, 381-392.
- Kupiec, J. J., Giron, M. L., Vilette, D., Jeltsch, J. M. and Emanoil-Ravier, R. (1987) Isolation of high-molecular-weight DNA from eukaryotic cells by formamide treatment and dialysis. *Anal. Biochem.* **164**, 53-59.

- 日下部岳広, 佐藤矩行 (1993) アクチン遺伝子の構造と発現調節. 蛋白質・核酸・酵素, 第38巻, pp. 721-730. (1993)
- Lassar, A. B., Buskin, J. N., Lockshon, D., Davis, R. L., Apone, S., Hauschka, S. D. and Weintraub, H. (1989) MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell* **58**, 823-831.
- Logan, S. K., Garabedian, M. J. and Wensink, P. C. (1989) DNA regions that regulate the ovarian transcriptional specificity of *Drosophila* yolk protein genes. *Genes Dev.* **3**, 1453-1461.
- Lyons, G. E., Buckingham, M. E. and Mannherz, H. G. (1991) α -actin proteins and gene transcripts are colocalized in embryonic mouse muscle. *Development* **111**, 451-454.
- Mahaffey, J. W., Coutu, M. D., Fyrberg, E. A. and Inwood, W. (1985) The flightless *Drosophila* mutant *raised* has two distinct genetic lesions affecting accumulation of myofibrillar proteins in flight muscles. *Cell* **40**, 101-110.
- Makabe, K. W. and Satoh, N. (1989) Temporal expression of myosin heavy chain gene during ascidian embryogenesis. *Dev. Growth Differ.* **31**, 71-77.
- Makabe, K. W., Fujiwara, S., Saiga, H. and Satoh, N. (1990) Specific expression of myosin heavy chain gene in muscle lineage cells of the ascidian embryo. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **199**, 307-313.
- McKnight, S. L. and Kingsbury, R. (1982) Transcriptional control signals of a eukaryotic protein-coding gene. *Science*, **217**, 316-324.
- Meedel, T. H. and Hastings, K. E. M. (1993) Striated muscle-type tropomyosin in a chordate smooth muscle, ascidian body-wall muscle. *J. Biol. Chem.* **268**, 6755-6764.
- Meedel, T. H. and Whittaker, J. R. (1983) Development of translationally active mRNA for larval muscle acetylcholinesterase during ascidian embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 4761-4765.

- Minty, A. and Kedes, L. (1986) Upstream regions of the human cardiac actin gene that modulate its transcription in muscle cells: presence of an evolutionarily conserved repeated motif. *Mol. Cell. Biol.* **6**, 2125-2136.
- Mita-Miyazawa, I., Ikegami, S. and Satoh, N. (1985) Histo-specific acetylcholinesterase development in the presumptive muscle cells isolated from 16-cell-stage ascidian embryos with respect to the number of DNA replications. *J. Embryol. exp. Morph.* **87**, 1-12.
- Miwa, T. and Kedes, L. (1987) Duplicated CArG box domains have positive and mutually dependent regulatory roles in expression of the human α -cardiac actin gene. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 2803-2813.
- Mohun, T. and Garrett, N. (1988) A third striated muscle actin gene is expressed during early development in the amphibian *Xenopus laevis*. *J. Mol. Biol.* **202**, 67-76.
- Mohun, T. J., Taylor, M. V., Garrett, N. and Gurdon, J. B. (1989) The CArG promoter sequence is necessary for muscle-specific transcription of the cardiac actin gene in *Xenopus* embryos. *EMBO J.* **8**, 1153-1161.
- Muscat, G. E. O., Gustafson, T. A. and Kedes, L. (1988) A common factor regulates skeletal and cardiac α -actin gene transcription in muscle. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 4120-4133.
- Nieuwkoop, P. D. and Faber, J. (1967) *Normal Table of Xenopus laevis (Daudin)*. 2nd ed. Amsterdam: North-Holland.
- Nishida, H. (1987) Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. III. up to the tissue restricted stage. *Dev. Biol.* **121**, 526-541.
- Nishida, H. (1990) Determinative mechanisms in secondary muscle lineages of ascidian embryos: development of muscle-specific features in isolated muscle progenitor cells. *Development* **108**, 559-568.
- Nishida, H. and Satoh, N. (1983) Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. I. Up to the eight-cell stage. *Dev. Biol.* **99**, 382-394.
- Nishida, H. and Satoh, N. (1985) Cell lineage analysis in ascidian embryos by intracellular injection of a tracer enzyme. II. The 16- and 32-cell stages. *Dev. Biol.* **110**, 440-454.

- Phan-Dinh-Tuy, F., Tuil, D., Schweighoffer, F., Pinset, C., Kahn, A. and Minty, A. (1988) The 'CC.Ar.GG' box. A protein-binding site common to transcription-regulatory regions of the cardiac actin, *c-fos* and interleukin-2 receptor genes. *Eur. J. Biochem.* **173**, 507-515.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Salzberg, A., Cohen, N., Halachmi, N., Kimchie, Z and Lev, Z. (1993) The *Drosophila Ras2* and *Rop* gene pair: a dual homology with a yeast Ras-like gene and a suppressor of its loss-of-function phenotype. *Development* **117**, 1309-1319.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**, 5463-5467.
- Sassoon, D. A., Garner, I. and Buckingham, M. (1988) Transcripts of α -cardiac and α -skeletal actins are early markers for myogenesis in the mouse embryo. *Development* **104**, 155-164.
- Satoh, N. (1979) On the 'clock' mechanism determining the time of tissue-specific enzyme development during ascidian embryogenesis. I. Acetylcholinesterase development in cleavage-arrested embryos. *J. Embryol. exp. Morph.* **54**, 131-139.
- Satoh, N., Deno, T., Nishida, H., Nishikata, T. and Makabe, K. W. (1990) Cellular and molecular mechanisms of muscle cell differentiation in ascidian embryos. *Int. Rev. Cytol.* **122**, 221-258.
- Slack, J. M. W (1991) *From Egg to Embryo: regional specification in early development*, Second Edition, Developmental and cell biology series 26, Cambridge: Cambridge University Press.
- Swalla, B. J. (1992) The role of maternal factors in ascidian larval muscle development. *Sem. Dev. Biol.* **3**, 287-295.

- Tomlinson, C. R., Beach, R. L. and Jeffery, W. R. (1987) Differential expression of a muscle actin gene in muscle cell lineages of ascidian embryos. *Development*, **101**, 751-765.
- Yasuo, H. and Satoh, N. (1993a) Function of vertebrate *T* gene. *Nature* **364**, 582-583.
- Yasuo, H. and Satoh, N. (1993b) An ascidian homolog of the mouse *Brachyury (T)* gene is expressed exclusively in notochord cells at the fate restricted stage. *Dev. Growth Differ.* in press.
- Yu, Y.-T., Breitbart, R. E., Smoot, L. B., Lee, Y., Mahdavi, V. and Nadal-Ginard, B. (1992) Human myocyte-specific enhancer factor 2 comprises a group of tissue-restricted MADS box transcription factors. *Genes Dev.* **6**, 1783-1798.
- Vandekerckhove, J. and Weber, K. (1978) Mammalian cytoplasmic actins are the products of at least two genes and differ in primary structure in at least 25 identified positions from skeletal muscle actins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 1106-1110.
- Vandekerckhove, J. and Weber, K. (1979) The complete amino acid sequence of actins from bovine aorta, bovine heart, bovine fast skeletal muscle and rabbit slow skeletal muscle. *Differentiation*, **14**, 123-133.
- Vandekerckhove, J. and Weber, K. (1984) Chordate muscle actins differ distinctly from invertebrate muscle actins. The evolution of the different vertebrate muscle actins. *J. Mol. Biol.* **179**, 391-413.
- Walsh, K. & Schimmel, P. (1988) DNA-binding site for two skeletal actin promoter factors is important for expression in muscle cells. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 1800-1802.

図と表

5' AATCAATC

1

Met Ser Asp Gly Glu Glu Asp Thr Thr Ala Ile Val Cys Asp Asn		42
AATTACATCTTCCAAGTTCATCTGTACTAAATAACAAACAAAGTC ATG TCT GAT GGT GAA GAA GAT ACA ACC GCA ATC GTC TGC GAC AAT		45
Gly Ser Gly Leu Val Lys Ser Gly Phe Ala Gly Asp Asp Ala Pro Arg Ala Val Phe Pro Ser Ile Val Gly Arg Pro Arg	42	
GGA TCA GGA TTG GTC AAG TCT GGT TTT GCT GGC GAT GAC GCA CCA CGA GCA GTT TTT CCA TCG ATC GTT GGT CGT CCA AGA	126	
His Gln Gly Val Met Val Gly Met Gly Gln Lys Asp Ser Tyr Val Gly Asp Glu Ala Gln Ser Lys Arg Gly Ile Leu Thr	69	
CAT CAA GGT GTC ATG GTC GGT ATG GGA CAG AAG GAC AGC TAC GTA GGA GAT GAG GCT CAA AGC AAA AGA GGA ATC CTC ACT	207	
Leu Lys Tyr Pro Ile Glu His Gly Ile Ile Thr Asn Trp Asp Asp Met Glu Lys Ile Trp His His Thr Phe Tyr Asn Glu	96	
TTG AAA TAT CCC ATT GAA CAT GGT ATT ATC ACA AAC TGG GAT GAT ATG GAA AAG ATC TGG CAT CAC ACC TTT TAC AAT GAA	288	
Leu Arg Val Ala Pro Glu Glu His Pro Thr Leu Leu Thr Glu Ala Pro Leu Asn Pro Lys Ala Asn Arg Glu Lys Met Thr	123	
CTC CGT GTC GCT CCT GAA GAA CAT CCA ACT CTT CTC ACA GAA GCT CCG TTG AAT CCA AAG GCA AAT AGG GAA AAG ATG ACA	369	
Gln Ile Met Phe Glu Thr Phe Asn Val Pro Ala Met Tyr Val Ala Ile Gln Ala Val Leu Ser Leu Tyr Ala Ser Gly Arg	150	
CAA ATT ATG TTC GAG ACC TTC AAT GTC CCA GGC ATG TAC GTC GCC ATT CAA GCT GTG CTA TCA CTA TAT GCT TCT GGA AGA	450	
Thr Thr Gly Ile Val Leu Asp Ala Gly Asp Gly Val Ser His Asn Val Pro Ile Tyr Glu Gly Tyr Ala Leu Pro His Ala	177	
ACA ACT GGT ATT GTA TTG GAT GCT GGT GAT GGT GTC TCC CAC AAT GTC CCG ATC TAC GAA GGA TAC GCT CTT CCT CAT GCC	531	
Ile Ala Arg Leu Asp Leu Ala Gly Arg Asp Leu Thr Asp Tyr Leu Met Lys Ile Leu Thr Glu Arg Gly Tyr Ser Phe Val	204	
ATC GCA AGG TTA GAT TTG GCC GGT CGT GAT CTA ACT GAT TAC TTG ATG AAG ATT CTC ACA GAA AGA GGA TAT TCT TTC GTC	612	
Thr Thr Ala Glu Arg Glu Ile Val Arg Asp Ile Lys Glu Lys Leu Cys Tyr Val Ala Leu Asp Phe Glu Gln Glu Met Ala	231	
ACT ACT GCC GAA CGT GAA ATC GTT CGT GAT ATC AAG GAA AAG TTG TGC TAC GTC GCA CTC GAC TTC GAA CAA GAG ATG GCA	693	
Thr Ala Ala Ser Ser Thr Ser Leu Glu Lys Ser Tyr Glu Leu Pro Asp Gly Gln Val Ile Thr Ile Gly Asn Glu Arg Phe	258	
ACT GCT GCA TCG TCG ACT TCA CTC GAA AAG AGC TAC GAA CTT CCG GAT GGA CAA GTT ATC ACT ATT GGA AAC GAA AGA TTC	774	
Arg Cys Pro Glu Thr Leu Phe Gln Pro Ser Phe Ile Gly Met Glu Ser Ala Gly Ile His Glu Thr Thr Tyr Asn Ser Ile	285	
CGT TGC CCG GAA ACT CTT TTT CAA CCG TCA TTC ATT GGT ATG GAA TCA GCT GGT ATT CAC GAA ACC ACG TAC AAT TCC ATC	855	
Met Lys Cys Asp Ile Asp Ile Arg Lys Asp Leu Tyr Ala Asn Asn Val Leu Ser Gly Gly Thr Thr Met Tyr Pro Gly Ile	312	
ATG AAA TGC GAT ATT GAC ATC CGT AAG GAT CTT TAC GCT AAC AAC GTT CTC TCT GGT GGA ACC ACC ATG TAT CCT GGT ATT	936	
Ala Asp Arg Met Gln Lys Glu Ile Thr Ala Leu Ala Pro Ser Thr Met Lys Ile Lys Ile Ile Ala Pro Pro Glu Arg Lys	339	
GCT GAT CGT ATG CAA AAG GAA ATC ACT GCC CTT GCT CCG AGT ACC ATG AAG ATC AAA ATC ATT GCT CCT CCT GAA CGT AAA	1017	
Tyr Ser Val Trp Ile Gly Gly Ser Ile Leu Ala Ser Leu Ser Thr Phe Gln Gln Met Trp Ile Ser Lys Gln Glu Tyr Asp	366	
TAT TCT GTC TGG ATT GGA GGA TCT ATC CTT GCT TCC CTC TCT ACC TTC CAA CAG ATG TGG ATT AGT AAA CAA GAA TAC GAT	1098	
Glu Ala Gly Pro Ser Ile Val His Arg Lys Cys Phe *	378	
GAA GCC GGA CCA TCC ATT GTT CAT AGA AAG TGT TTC TAA TTCACATATCCAGCTATGCACTATTCAGTGTACCGACTTAAATTATTACATTTC	1189	
CATGAATTGCCGTTTGTTATGATGTCAATAAAATTCGACTCTGTaaaaa		3'

図2. HrcMA4の塩基配列と予想されるアミノ酸配列

翻訳領域の塩基配列の上に予想されるアミノ酸配列を示した。終止コドンはアステリスク (*) で示した。ポリ A 付加シグナルと推定される配列に下線をひいた。

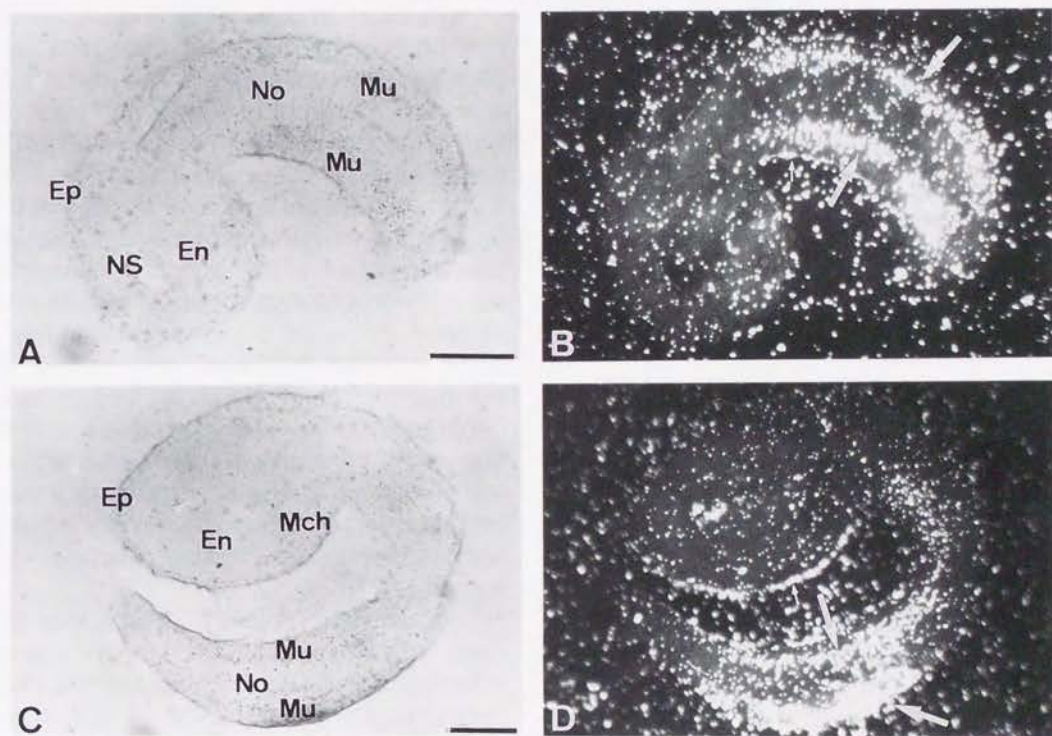


図 3. HrMA4アクチン遺伝子の尾芽胚期における発現

HrcMA4の3'側非翻訳領域をプローブに用いて、マボヤ初期尾芽胚（A, B）および後期尾芽胚（C, D）の切片に対する *in situ* ハイブリダイゼーションをおこなった。A, Cは明視野，B, Dは暗視野で観察したもの。

En：内胚葉，Ep：表皮，Mch：間充織，Mu：筋肉，No：脊索，NS：中枢神経系。

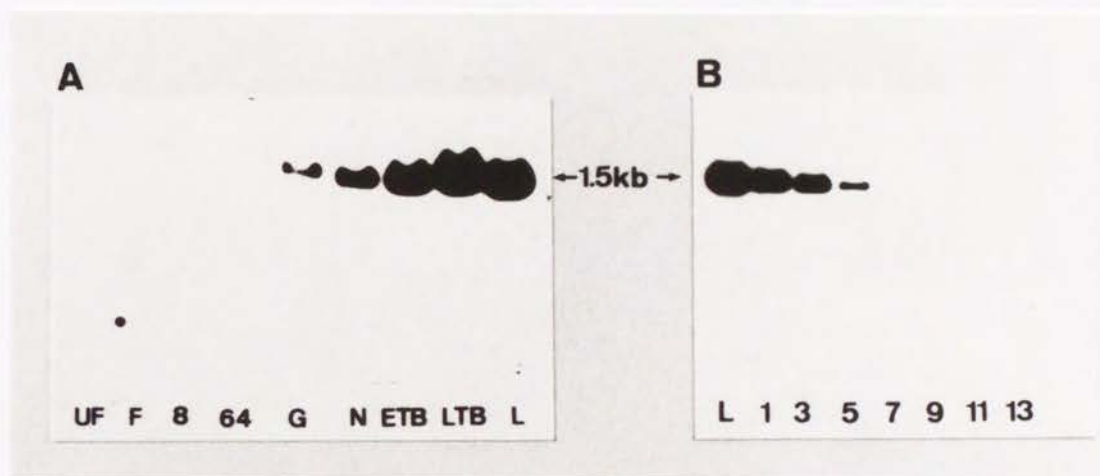


図4. 発生過程における HrMA4アクチンmRNA量の変化

各発生段階の試料から10 μ gのポリ(A)⁺ RNAを調製し, HrMA4の3'側非翻訳領域をプローブに用いて, ノーザンブロット解析をおこなった.

(A) 胚発生過程におけるHrMA4 mRNA量の変化. UF: 未受精卵, F: 受精卵, 8: 8細胞胚, G: 囊胚, ETB: 初期尾芽胚, LTB: 後期尾芽胚, L: 遊泳幼生.

(B) 変態過程におけるHrMA4 mRNA量の変化. L: 遊泳幼生, 1: 変態後1日, 3: 変態後3日, 5: 変態後5日, 7: 変態後7日, 9: 変態後9日, 11: 変態後11日, 13: 変態後13日.

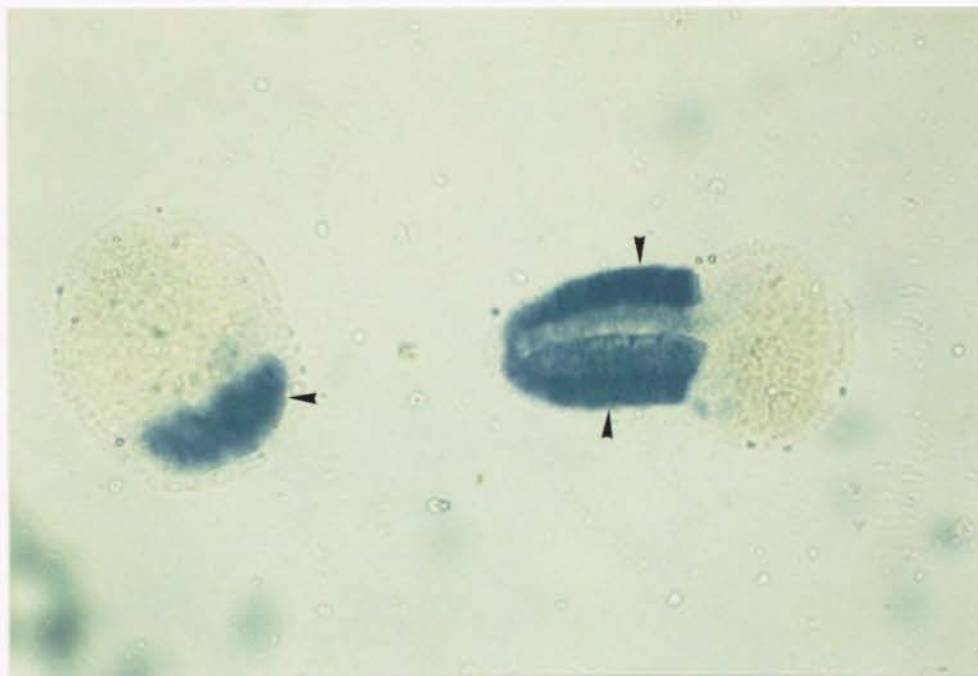


図5. HrcMA4の翻訳領域をプローブに用いておこなった
ホルマウント *in situ*ハイブリダイゼーション
左側の胚は神経胚期，右側の胚は初期尾芽胚期である．矢じりで
示した予定筋肉細胞で特異的にシグナルがみられる．

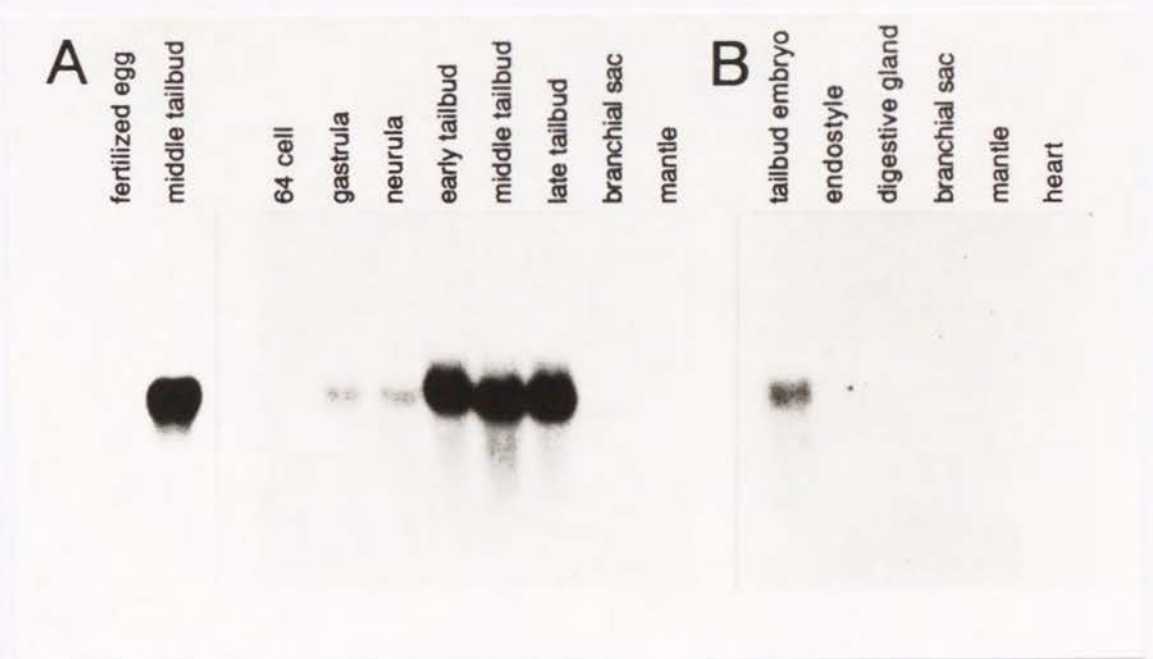


図6. *HrMA1*遺伝子の発現様式

(A) 初期発生過程における*HrMA1*の発現. 各発生段階の胚から $10\mu\text{g}$ のポリ(A)⁺ RNAを調製し, *HrMA1*の3'側非翻訳領域をプローブとして用いてノーザンブロット解析をおこなった. 対照として成体組織(エラ, 体壁)から調製した $10\mu\text{g}$ のポリ(A)⁺ RNAを同時に泳動した(右端および右から2番目のレーン).

(B) 成体の各組織における*HrMA1*の発現. *HrMA1*の全長をプローブに用いた. 1レーンあたり $10\mu\text{g}$ のtotal RNAを泳動した. 対照として尾芽胚から調製したtotal RNAを $10\mu\text{g}$ 泳動した(左端のレーン).

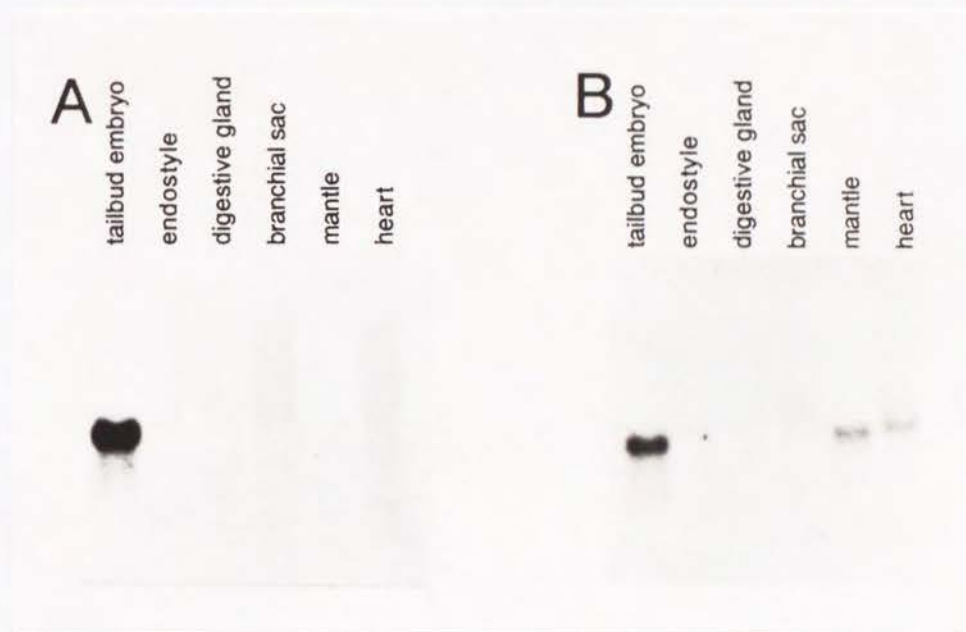


図7. 成体における筋肉アクチン遺伝子の発現

HrcMA2の翻訳領域をプローブに用いて、成体の各組織から調製した10 μ gのtotal RNAのノーザンブロット解析をおこなった。

(A) ハイブリダイゼーションを44℃でおこなった場合。

(B) Aと同じブロットを用いて39℃でハイブリダイゼーションをおこなった場合。

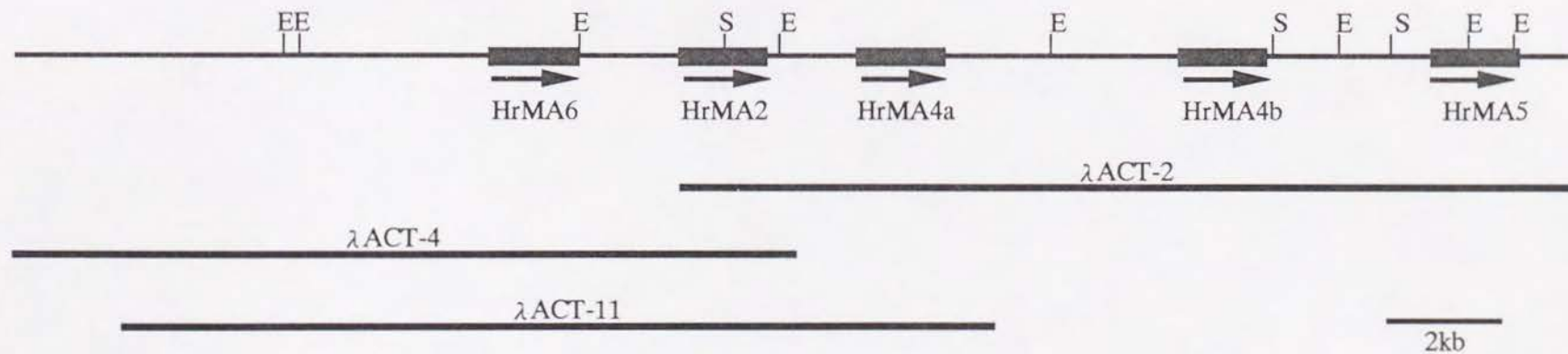


図8. 筋肉アクチン遺伝子クラスターの制限酵素地図

染色体上の約30 kbの領域に5個のアクチン遺伝子 (*HrMA2*, *HrMA4a*, *HrMA4b*, *HrMA5*, *HrMA6*) が同じ向きに並んでいる。各遺伝子の位置を黒い長方形で、その向きを矢印 (先端が3'側) で示した。制限酵素地図の下に3個のゲノムDNAクローン (λ ACT-2, λ ACT-4, λ ACT-11) の対応する位置を示した。

E : *EcoRI*部位, S : *SalI*部位。

	Glu Ala Gly Pro Ser Ile Val His Arg Lys Cys Phe *	1521	1540	3'non-coding region
HrMA4a/b(gene)	GAA GCC GGA CCA TCC ATT GTT CAT AGA AAG TGT TTC TAA TTCACATCTCCAGCTATGCACCATTCACTG			-----
HrcMA4(cDNA)	...		A.....T.....	-----
HrMA2(gene)C.....	-----
HrcMA2(cDNA)	-----
HrMA5(gene)	...		A..T.T.....C.....	-----
HrMA6(gene)	...A...		A.....C.....	CACTGTA

	1560	1580	1600	1620
HrMA4a/b	---TACGGACTTAAATTATTACCATTTCCATGAATTGCCGTTTGTATGATGTCAAATAAAATTCGACTCTGTAAAAAATTGAATATGA			
HrcMA4	---			poly(A)
HrMA2	---	A...G...A.TC.....	T.....	C.....AAACAATTGATAACAA
HrcMA2	---	A...G...A.TC.....	T.....	C.....poly(A)
HrMA5	---	A.----.A.TC.....	AT.....	AC.....AAACAATTGATAAAAA
HrMA6	CTG.....C.G.....	A.TC.....	C...AT.....	A.....AAACAATTGATGATAA

図9. クラスターに含まれる5個の遺伝子の3'側翻訳領域および非翻訳領域の塩基配列の比較

HrMA4a	TAGAACTCAATTGTTGCGACGTACCGCCAGTTGAACGATATATCCACCATTGCTATTCTTAAGTTACTCCTTTTATGGTCATCGCACTTCTCATTACGAATTGCGCG	-78
HrMA2A.....G.....G.....	-79
HrMA4a	1 TGATAACAACGTCTTCATTTTTTCG-CTTCTCCGTTTCTTTCAGTATATAAGCCCTCTATCGTTCCGTTATATTCATCACCAAGCTTGTACAGTCAATCAATC	29
HrMA2TTT.G..A.....A.....TT.A.....G.....	29
HrMA4a	AATTACACCTTCTAAGTTCTATCTGTACTAAATAACAAAAAAATC	15
HrMA2	Met Ser Asp Gly Glu Asp Thr Thr Ala Ile Val Cys Asp Asn ..C...T.C..C.....ATG TCT GAT GGT GAA GAA GAT ACA ACC GCA ATC GTC TGC GAC AAT	121 121
HrMA4a	Gly Ser Gly Leu Val Lys Ser Gly Phe Ala Gly Asp Asp Ala Pro Arg Ala Val Phe Pro Ser Ile Val Gly Arg Pro Arg	42
HrMA2	GGA TCA GGA TTG GTC AAG TCT GGT TTT GCC GGT GAT GAC GCA CCA CGA GCA GTT TTT CCG TCA ATC GTT GGT CGT CCA AGA	202 202
HrMA4a	His Gln Gly Val Met Val Gly Met Gly Gln Lys Asp Ser Tyr Val Gly Asp Glu Ala Gln Ser Lys Arg Gly Ile Leu Thr	69
HrMA2	CAT CAA GGT GTT ATG GTC GGC ATG GGA CAG AAG GAC AGC TAC GTA GGA GAT GAG GCT CAA AGC AAA AGA GGA ATC CTC ACT	283 283
HrMA4a	Leu Lys Tyr Pro Ile Glu His Gly Ile Ile Thr Asn Trp Asp Asp Met Glu Lys Ile Trp His His Thr Phe Tyr Asn Glu	96
HrMA2	TTG AAA TAT CCC ATT GAA CAT GGT ATC ATC ACA AAC TGG GAT GAT ATG GAA AAG ATC TGG CAT CAC ACC TTC TAT AAT GAA	364 364
HrMA4a	Leu Arg Val Ala Pro Glu Glu His Pro Thr Leu Leu Thr Glu Ala Pro Leu Asn Pro Lys Ala Asn Arg Glu Lys Met Thr	123
HrMA2	CTC CGT GTC GCT CCT GAA GAA CAT CCA ACT CTT CTC ACA GAA GCT CCG TTG AAT CCC AAG GCA AAT AGA GAG AAG ATG ACA	445 445
HrMA4a	Gln Ile Met Phe Glu Thr Phe Asn Val Pro Ala Met Tyr Val Ala Ile Gln Ala Val Leu Ser Leu Tyr Ala Ser Gly Arg	150
HrMA2	CAA ATT ATG TTC GAG ACC TTC AAC GTC CCA GCC ATG TAC GTC GCC ATT CAA GCT GTG CTA TCA CTA TAT GCT TCT GGA AGA	526 526
HrMA4a	Thr Thr Gly (Intron I)	153
HrMA2	ACA ACT G/ GTAAGTGTATGACAATTGGTAATGTAGTTTGTTCGTATAAATCAACAAATATGTCACACTCCGTTTGAACAAATCGTAATAGCAGGGGTGTCA	629
HrMA2G...A.T.....T.....A..A.....TCGTC.GTGGC..CA.T.C-----	588
HrMA4a	GTGTGGATTTTCAAGCGAGGTCTAGGGAATACTTGCATTATCATATATTGATTGATTCTGTTTAAAAATACATTAGCTACTATCAAA-TGATTCTGTACGA	736
HrMA2C.....	608
HrMA4a	Gly Ile Val Leu Asp Ala Gly Asp Gly Val Ser His Asn Val Pro Ile Tyr Glu Gly Tyr Ala Leu Pro His Ala	177
HrMA2	TTATAG /GT ATT GTA TTG GAT GCT GGT GAT GGT GTC TCC CAC AAC GTC CCC ATC TAC GAA GGA TAC GCT CTT CCT CAT GCT	810 688
HrMA4a	Ile Ala Arg Leu Asp Leu Ala Gly Arg Asp Leu Thr Asp Tyr Leu Met Lys Ile Leu Thr Glu Arg Gly Tyr Ser Phe Val	204
HrMA2	ATC GCA AGG TTA GAT TTG GCC GGT CGT GAT CTA ACT GAT TAC TTG ATG AAG ATT CTC ACA GAA AGA GGA TAT TCT TTC GTT	891 769
HrMA4a	Thr Thr Ala Glu Arg Glu Ile Val Arg Asp Ile Lys Glu Lys Leu Cys Tyr Val Ala Leu Asp Phe Glu Gln Glu Met Ala	231
HrMA2	ACT ACT GCC GAA CGT GAA ATC GTT CGT GAT ATC AAG GAA AAG TTA TGC TAC GTC GCA CTC GAC TTC GAA CAA GAG ATG GCA	972 850
HrMA4a	Thr Ala Ala Ser Ser Thr Ser Leu Glu Lys Ser Tyr Glu Leu Pro Asp Gly Gln Val Ile Thr Ile Gly Asn Glu Arg Phe	258
HrMA2	ACT GCA GCT TCG TCT ACT TCA CTC GAA AAG AGC TAC GAG CTT CCC GAT GGA CAA GTT ATC ACT ATT GGA AAC GAA AGA TTC	1053 931
HrMA4a	Arg Cys Pro Glu Thr Leu Phe Gln Pro Ser Phe Ile Gly (Intron II)	271
HrMA2	CGT TGC CCG GAA ACT CTT TTC CAG CCT TCA TTC ATT G/ GTAAGTTGAAAGCTTCATCATCTGTTTCATCAACGAAGATATACAA-----TATT	1139
HrMA2T.....A..G.....T.....ACGAAAGG.AA	1024
HrMA4a	TCCTTTGCGATTCCGATTTCATAAGCGACATACTAATGAATATGTTATTGTGAG	283
HrMA2A...C..A...T...G.....T.....A...A...T.....Gly Met Glu Ser Ala Gly Ile His Glu Thr Thr Tyr Asn	1232 1117
HrMA4a	Ser Ile Met Lys Cys Asp Ile Asp Ile Arg Lys Asp Leu Tyr Ala Asn Asn Val Leu Ser Gly Gly Thr Thr Met Tyr Pro	310
HrMA2	TCC ATC ATG AAA TGC GAT ATT GAC ATC CGT AAG GAT CTT TAC GCT AAC AAC GTT CTC TCT GGT GGA ACC ACC ATG TAT CCT	1313 1198
HrMA4a	Gly Ile Ala Asp Arg Met Gln Lys Glu Ile Thr Ala Leu Ala Pro Ser Thr Met Lys Ile Lys Ile Ile Ala Pro Pro Glu	337
HrMA2	GGT ATT GCT GAT CGT ATG CAA AAA GAA ATC ACA GCC CTT GCT CCG AGT ACC ATG AAG ATC AAA ATC ATT GCT CCT CCT GAA	1394 1279
HrMA4a	Arg Lys Tyr Ser Val Trp Ile Gly Gly Ser Ile Leu Ala Ser Leu Ser Thr Phe Gln Gln Met Trp Ile Ser Lys Gln Glu	364
HrMA2	CGT AAA TAT TCT GTC TGG ATT GGA GGA TCG ATC CTT GCT TCC CTC TCT ACC TTC CAA CAG ATG TGG ATT AGC AAA CAA GAA	1475 1360
HrMA4a	Tyr Asp Glu Ala Gly Pro Ser Ile Val His Arg Lys Cys Phe #	378
HrMA2	TAC GAT GAA GCC GGA CCA TCC ATT GTT CAT AGA AAG TGT TTC TAA TTCACATCTCCAGCTATGCACCATTCACTGTACGGACTTAAATTATT	1567 1452
HrMA4a	ACCATTTCCATGAATTGCCGTTTGTATGATGTCAAATAAATTCGACTCTGTAATAAATGAATATGAATTTCTTAATTTCTTGAAGGGGAAATTACATTTTCAT	1674
HrMA2A..G...A.TC.....T.....C.....C.....-..AC...AA.T.CTTAAGT.ATT..G.A.....TT...C...	1558
HrMA4a	AGATATAATATGATTACACTATTCGGAATATAGTGAGTAAATAACATTTCATTCAATAAATGATGCTACATGGAATAATTAATA	1760
HrMA2	...CC...C.....T.....	1582

図 10. HrMA4a遺伝子とHrMA2遺伝子の塩基配列

HrMA4aの塩基配列の下にHrMA2の塩基配列を並べて示した。HrMA2の塩基配列がHrMA4aと同じ箇所は点(・)で省略した。両遺伝子の配列には適宜、横線(ー)を挿入した。翻訳領域の塩基配列の上に予想されるアミノ酸配列を示した。2つの遺伝子がコードするアミノ酸配列はまったく同じである。

A

```

-550
ATTACATGATATAAAATACAGACATGAAAATCATTTATCCGAATGGTACTTGACATTAAAATA

-500
AAAAACGTACTGAAACTTACGACCAGCATCTTTATGCCCAACTTTCACTGACCTCTGCTT
E-box

-450
AAAGACTAGTGTGTTGATTGTCCCTGGTTTAGAAAAAGTTCGTTGACCAAATTTTTCGAAGTT
E-box -400

GGAGGCGGAGGAAACCATCCAAAATTCACGTGTAGAAATTCATCTGGTCCAATAAAAATTA
E-box -350 E-box

-300
TTACCAATTAGGAATTGTGAATAGGATTGCATTTTCATCAACTAATACCTGCATAAAAAATTA

-250
TTACTAATTTGTGAACAGACCGCAAAATATTCTTTACTGGACTTCGCTGCTGTTATTCACGAC

-200 Spl E-box E-box E-box -150
ACCAAGGCCGCCAAGTGTAGAACTCAATTGTTGCGACGTACCGCCAGTTGAACGATATATC
CArG box -100

CCACCATGCTATTCTTAAGTTACTCCTTTTATGGTCATCGCACTTCTCATTACGAATTGCGC
E-box -50 TATA box

GTGATAACAACCTGCTCTTCAATTTTTTCCGCTTCTCCTCGTTTCTTTCAGTATATAAGCCCTCT
+1

ATCGTTTCGCTTATATTCATCACCAAGCTTGTACAGTCAATCAATCAATTACACCTTCTAAGT

+50 MetSerAspGlyGluGluAspThrThrAlaIle
TCTATCTGTACTAAATAACAAAACAAAATCATGTCTGATGGTGAAGAAGATACAACCGCAATC

```

B



図 1 1. *HrMA4a* 遺伝子上流領域の塩基配列

(A) *HrMA4a* 遺伝子の翻訳開始点付近から転写開始点 (+1) の上流約 570 bp までの塩基配列を示した。転写される領域には下線をひき、翻訳領域の上には予想されるアミノ酸配列を示した。Eボックス配列, CArGボックス配列, TATAボックス配列および Sp1 結合部位コンセンサス配列を網かけで表示した。

(B) プライマー伸長法による *HrMA4a* の転写開始点の決定。プライマー伸長法の反応産物 (P) を、ジデオキシ法による塩基配列決定反応の産物 (G, A, T, C) と同時に、ポリアクリルアミドゲル電気泳動をおこなって解析した。

		E-box	E-box	E-box	
HrMA4a	ACACCAAGGCCGCCCAAGTGTAGAACTCAATTGTTTCGCACGTACCGCCAGTTGAACGATATATCCCACCAT	-134			
HrMA4b	.T.....A.AG.....G.....T.....				
HrMA2A.A.A.A.....A.....				
HrMA5TC..TA.AG.....G.....T.....G.....				
HrMA6	G.CAACGATA.A.A.....C.....				
		CArG box		E-box	
HrMA4a	GCTATTCTTAAGTTACTCCTTTTATGGTTCATCGCACTTCTCATTACGAATTGCGCGTGATAACAACCTGTCT	-63			
HrMA4bT..G.....G.....				
HrMA2G.....G.....				
HrMA5T..G.....G.....				
HrMA6C...G.....G.....C...G.....C..T.				
		TATA box		+1	
HrMA4a	TCATTTTTCCTG-CTTTCCTCCGTTTCTTTTCAGTATATAAGCCCTCTATCGTTCGCTTATATTCATCACCA	+8			
HrMA4b-.....A.....				
HrMA2TTTT.G..A.....A.....TT.A.....				
HrMA5-.....				
HrMA6TT.---.A.A..A..G.....C.....AC.....				
				Met	
HrMA4a	AGCTTGTACAGTCAATCAATCAATTACACCTTCTAAGTTCTATCTGTACTAAATAACAAAACAAATCATG	+79			
HrMA4bC.....TC.....				
HrMA2	...G.....C.....T.C..C.....				
HrMA5T...C.G.....C.....				
HrMA6A.....TC.....A.....				

図 1 2. クラスターに含まれる 5 個の遺伝子上流領域の塩基配列の比較

最上段に *HrMA4a* の塩基配列を示した。 *HrMA4a* の配列の下に他の 4 つの遺伝子の塩基配列を並べ、 *HrMA4* と同じ塩基の箇所は点 (・) で表した。 各々の遺伝子の 3' 側非翻訳領域の配列には、一部に横線 (—) を挿入し、 *HrMA4a* との一致が最大になるようにした。 転写開始点を (+1) とした。 E ボックス配列、 CArG ボックス配列および TATA ボックス配列を網かけで表示した。

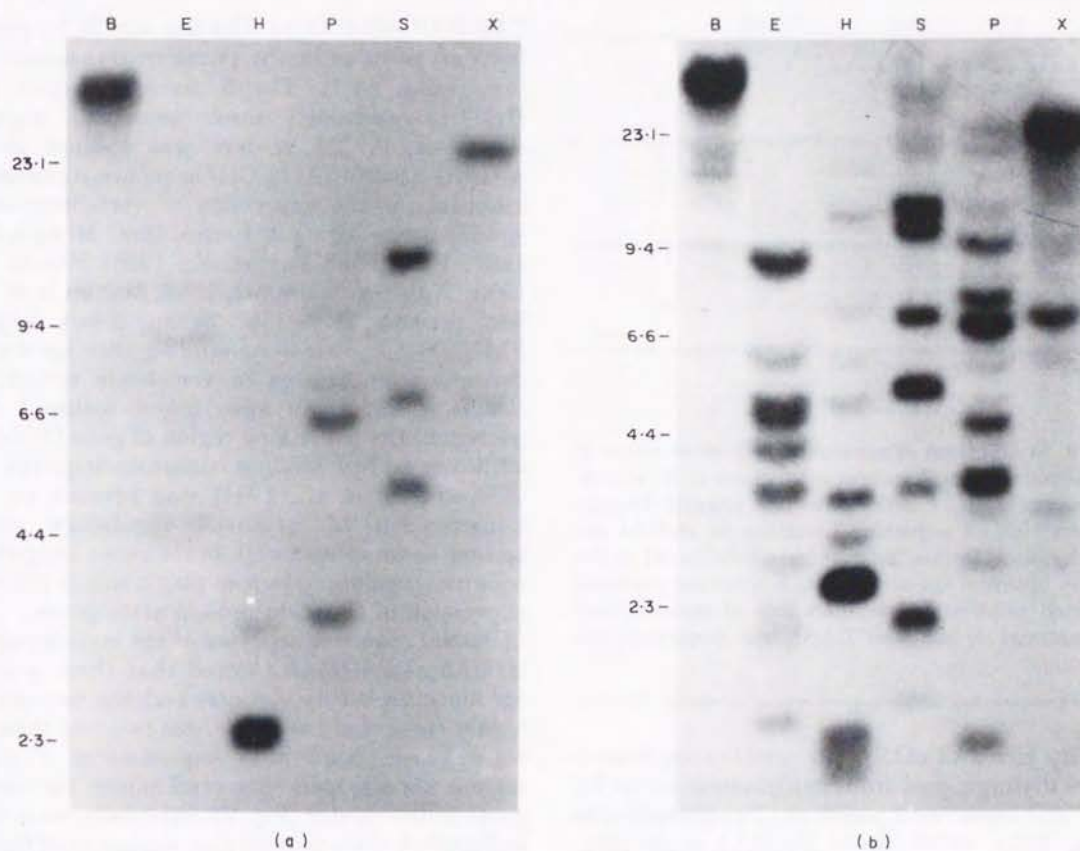


図 13. *HrMA4*プローブを用いたゲノム DNAのサザンブロット解析

(a) *HrcMA4*の非翻訳領域をプローブとして用いた場合. (b) *HrcMA4*の翻訳領域をプローブとして用いた場合. 図の左側の数字は分子量 (kb) を示す.

B : *Bam*HI, E : *Eco*RI, H : *Hind*III, S : *Sal*I, P : *Pst*I, X : *Xba*I.

ACGATCGAGTGTGCAATTTGCATGTGGGAAGCGTATCCTTCATAAATTTGGACACGTTGTATGGAAACCGGCTCCGAGATCCAAAACGATTTCCaaacaga -955
D L R A I A H P L A Y G E Y I P V N H S V G D G S D L V I G

gaatcaatcaatttataatgatgatgtgcacgaaaggttaacgacttggtagaggtttctaagttttacacacCTGTAGTCTCTCTGATGCATAAAGC -855
T T R G S A Y L

GAAGAAGACGCTTGAATAGCGAGCTACATTGCCGGAACGTTGAAAGTTTCAACATAATCTGAGTCATCTTCTCTGTTGGCTTTAGGGTTGAOTGGAG -755
S L V A Q I A V Y H A P V N F T E F M I Q T M K E R N A E K P N L P A

CTTCCGTAAAGAGTGGGATGTTCTCTCAGGAGCAACAGGAAGTTCATTGTAGAAAGTATGATTCCAAATCTCTCCATATGTCGCCAGTTTGTATGAT -655
E T L L T P H E E P A V R L E N Y F T R H W I K E M D D W N T I I

TCCATGTTCAATTGGATATTGAGAGTGAGAATTCCTCTTTACTTTGGGCTTCATCACCGACATAACTGTCTTTCTGTCCCATACCAACCATGACACCT -555
G H G I P Y L L T L I G R K S Q A E D G V Y S D K Q Q M G V M V G

TGATGCTTGGTGTCCGACGGTGGATGAAAAACAGCTCTGGGAGCGTCATCAGCGCGGAATCCAGATTAAACCAATCTGTATCGGTTGTCCGACGGA -455
Q B R P R G V T S P F V A R P A D D G A F G S E V L G S G N D C V I

TTGCGGTTGTCTTCTTCTCAGCGTCAGACATATTTGTAAATTATCAAGTAGTTACTATAAAATCTTTAGTAAAACTTGGAAATGTTGATGTTGTGAATGC -355
A T G D E E G D S H

AACGAAGATGTGATGatatacagatagatagaggctatatttatatcagtatatttcaacacgattgggggtatgaagagattgttgcgccgcagatoga -255
HrMalb -- +1

ctcgcttaatatggttaaaaactcgtgaagggttagtaacagttgcctttcgacctaattatttggagccaactcaacgtgaatgagaaaaatggctactgc -155
actactacgcttggttaccctctacttttctcagtaattcttctataataaactcctgcgattaggagcgaaaaaactttatgtgtgaagcatgca -55
+1 -> HrMalb

acttagcagctgaagaagtgctgatataaatatggtctctatccatccagaatCATCACATCTTCGTTGGAGTATCAACATCAACATTCACAGTTTTCa -446

M S D G E E D Q T A I V C N D N G S G L V K

TTCTAGCTGTTATAGTAACAACTTGAATAATTACAAATATGTCCGAGCGTGAAGAGATCAAAACCGCAATCGTCTGGCAACACGGATCAGGATTGGTCAa -146

S G F A G D D A P R A V F P S T V P R R H Q G V M V G M G Q K D

ATCTGGTTTCCGCCGTGACGACGCTCTAGAGCTGTATTTCCATCCACCGTCCGAGCAACCAAGACATCAGGGTGTCATGGTTGGTATGGGACAGAAAGAC +246

S Y V G D E A Q S K R G I L T L L Y P I G H G I I T N W D D M E K

AGTATGTGGTGATGAAGCCCAAGTAAAGAGGAATTTCTCACTCTCAATATCCAATTGAACATGGAATCATTACAACTGGGACGATATGGAGAGA +346

I W H H T F Y N E L R V A P E E H P T L L T E A P L N P K A N R E K

TTTGGCATCATATTTCTACAATGAACCTCGTGTTCCTCTGAGGAACATCCCACTCTTCTTACGGAAGCTCCCACTCAATCTTAAAGCCACAGAGAGAA +446

M T Q I M F E T F N V P A M Y V A I Q A V L S L Y A S G R T T

GATGACTCAGATTATGTTTGAACCTTTCAACGTTCCGGCAATGTACGTGCTATTCAAGCTGTTCTTTGCTTTATGCATCAGGAAGAAGCTACAGgttgg +546

G I V L D S G D

taggaattcagaacacttcacacagctgttaccctctgtgacatatctattataaattgattgattctctgttttagGAATCTCTTTGGATCTGGAGA +646

G V S H N V P I Y E G Y A L P H A I A R L D L A G R D L T D Y L M

CGGTGTTTCACATAACGTGCCAATTTATGAAGATACGCTCTTCCACATGCAATTGCAAGACTCGATCTTCCCGAGCGATGATCTCACTGATTATCTTATG +746

K I L T E R G Y S F V T T

AAAAATCTCAGACAGAGAGGATATTCATTGTGTACAATGgttaaaaaataactcaagcaatgatcaagaatggttaataacatctttgttatacaaatat +846

A E R E I V R D I K E K L C Y V A L D F E Q E M A T A A S

ttgtcccatgaatagCTGAACGAGAAATTTGCCGAGATATCAAGAAAAAGCTCTGTATGTTGCTCTGGACCTTTGAACAAGAAATGCCAACTGCCGCCCTC +946

S T S L E K S Y E L P D G Q V I T I G N E R F R C P E T L F Q P S

GTCTACTCTTTTGAAAAAGTTACGAATTACCAAGTGGTCAAGTAGTACAAATGGTATGAAGAGTCCGATGCGCTGAACTCTTTTCCAACCATCC +1046

F I

G M E S A

TTCAATTGtaagttgaatgaataactattacataaataacacttcaagattgttcacagtttaataatgttgttatataaattatagGAATGGAATCTGC +1146

G I H E T T Y N S I M K C D I D I R K D L Y A N N V L S G S T M

TGGCATCCATGAACACATACAACTCAATATGAATGTGACATCGATATTCGCAAGAGCTTTACGCCAACACAGTCTTATACGGAGGAGTCCACATG +1246

Y P G I A D R H Q K E I T A L A P S T M K I K I I A P P E R K Y S

TATCTCGTATGCTGATCGTATGCAAAAGGAAATCACAGCCCTTGCTCCGACCAATGAAGATAAAAAATCATTGCTCCCCCTGAACGAAAGTACTCGG +1346

V W I G I G S I L A S L S T F Q Q M W I T K Q E Y D E A G P S I V H R

TATGGATCGGAGGTTCCATTTTGGCATCTCTTTCAACTTTCCAAACAATGTGGATCACCAACAAGAAATATGACGAAGCTGGTCCATCAATATGTTATAG +1446

K C F *

AAAAATGTTTCTAATCGTCGACTGAATCAGCTGTCTTCAACCTTGGGTGTATATTCTTAAATGTTCTGTATGGTAGGAGAAATATGATCGCTAGGTGAT +1546

GCTATAGAGTTTAGAGCTACAAAAATATTTTCTTGATAATTCTCGCCAATCACAATTTTTCGGCTTGATTGTAATGAACGCAATTCAGGATATA +1646

ATTCACAACTCTCTTGAGATGAATAAATATACCTTAAAGAGTAGTAGCAATACCAATAGTTGGAAAAATCGAAGTATATTACTGATTGAATAAAGTA +1746

TAACATAAATATAATTGTTGTTAGTTATTTGGCAAGTGCAAGTAATTTAAGTTAATGTTTAAAGCAGTCTATTGTTTGCATTGAACCATGCTACGAT +1846

TACGTAATATAGG

+1946

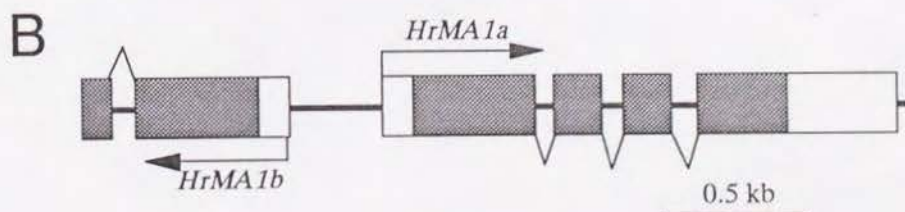


図14. *HrMA1*遺伝子対

(A) *HrMAI*遺伝子の塩基配列。 *HrMAIa*の転写開始点を+1とした。翻訳領域には塩基配列の下に予想されるアミノ酸配列を示した。終止コドンはアステリスク (*) で示した。

(B) *HrMAI* 遺伝子対の模式図。エキソン部分を長方形で表した。白ヌキの長方形は非翻訳領域、網かけの長方形は翻訳領域である。矢印は転写開始点および転写の方向を表す。

A

```

CATATTTGTA ATTATTCAAG TAGTTACTAT AAAATCTTTA GTAAAACTT GGAATGTTGA TGTGTGAAT GCAACGAAGA -347
GTATAACAT TAATAAGTTC ATCAATGATA TTTTAGAAAT CATTTTTGAA CCTTACAACT ACAACACTTA CGTTGCTTCT +8
HrMA1b-Met

TGTGATGATA TCGAGATCGA TAGAGGCTAT ATTTATATCA GTATTTTCAC ACCGATTGGG GGTATGAAGC GATTTGTTTCG -267
ACACTACTAT AGCTCTAGCT ATCTCCGATA TAAATATAGT CATAAAAGTG TGGCTAACCC CCATACCTCG CTAACAACGC -73
+1 TATA box

CCCGCAGATC GACTCGCTTA ATATGGTAAA AAACCTCGTA AGGGTAGTAA CAGTTGCCTT TCGCACCTAR TTATTGGAGC -187
GGGCGTCTAG CTGAGCGAAT TATACCATTT TTTGAGCACT TCCCATCATT GTCAACGGAA AGCGTGGATT AATAACCTCG -153
CarG-like-2

CAACTCAACG TGAATGAGAA AATGGCTACT GCACTACTAC GCTTGTACC CACTACTTTT CATCGTAAAT TCTTCTATAT -107
GTTGAGTTGC ACTTACTCTT TTACCGATGA CGTGATGATG CGAACAATGG GTGATGAAAA GTAGCATTTA AGAAGATATA -233

CAACTCCTCT GCCGTATTAG GAGCGAAAAA CTTTATGTG TGAAAGCATG CAGCTTAGGA CGTGAGAAAG TGCTGATATA -27
TTTGAGGAGA CGGCATAATC CTCGCTTTTT GAAAATACAC ACTTTCGTAC GTCGAATCCT GCACTCTTTC ACGACTATAT -313
+1

AATATGGCTT CTATCCATCT CAGAATCATC ACATCTTCGT TGCATTCATA ACATCAACAT TCCAAGTTTT CATTCTAGCT +54
TTATACCGAA GATAGGTAGA GTCTTAGTAG TGTAGAAGCA ACGTAAGTAT TGTAGTTGTA AGGTTCAAAA GTAAGATCGA -393

Met→HrMA1a
GTTATAGTAA CAACTTGAAT AATTACAAAT ATG +87
CAATATCATT GTTGAACCTA TTAATGTTA TAC -426

```

B

```

CarG-like-1: CCGTATTAGG
:: :::::
CarG-like-2: CCATATTAAG

```

C

```

E-box
HrMA1: GTAGTAACAGTTGCCTT
:: :::::
HrMA4a: GTGATAACAACCTGTCTT

```

図15. *HrMA1*遺伝子対のプロモーター領域の塩基配列

(A) *HrMA1a*遺伝子の翻訳開始コドンと*HrMA1b*遺伝子の翻訳開始コドンの間にはさまれた5'非翻訳領域およびプロモーター領域の塩基配列を示した。転写される領域は薄い網かけで、Eボックス配列、CarG-like配列、MEF-2-like配列およびTATAボックス配列を濃い網かけで表示した。2本鎖DNAの両方の鎖を示し、転写開始点を+1として図の右側に両方の遺伝子についての塩基番号を示した。

(B) *HrMA1*上流の2個のCarG-like配列の比較。10残基中8残基までが一致している。両者で異なる箇所はどちらもプリン塩基(G, A)である。

(C) *HrMA1*上流のE-boxと*HrMA4a*上流の転写開始点の最も近くに位置するEボックスおよびその周囲の塩基配列の比較。17残基中12残基が一致している。一致していない箇所においてもプリン塩基(A, G)、ピリミジン塩基(T, C)の一致がみられる。

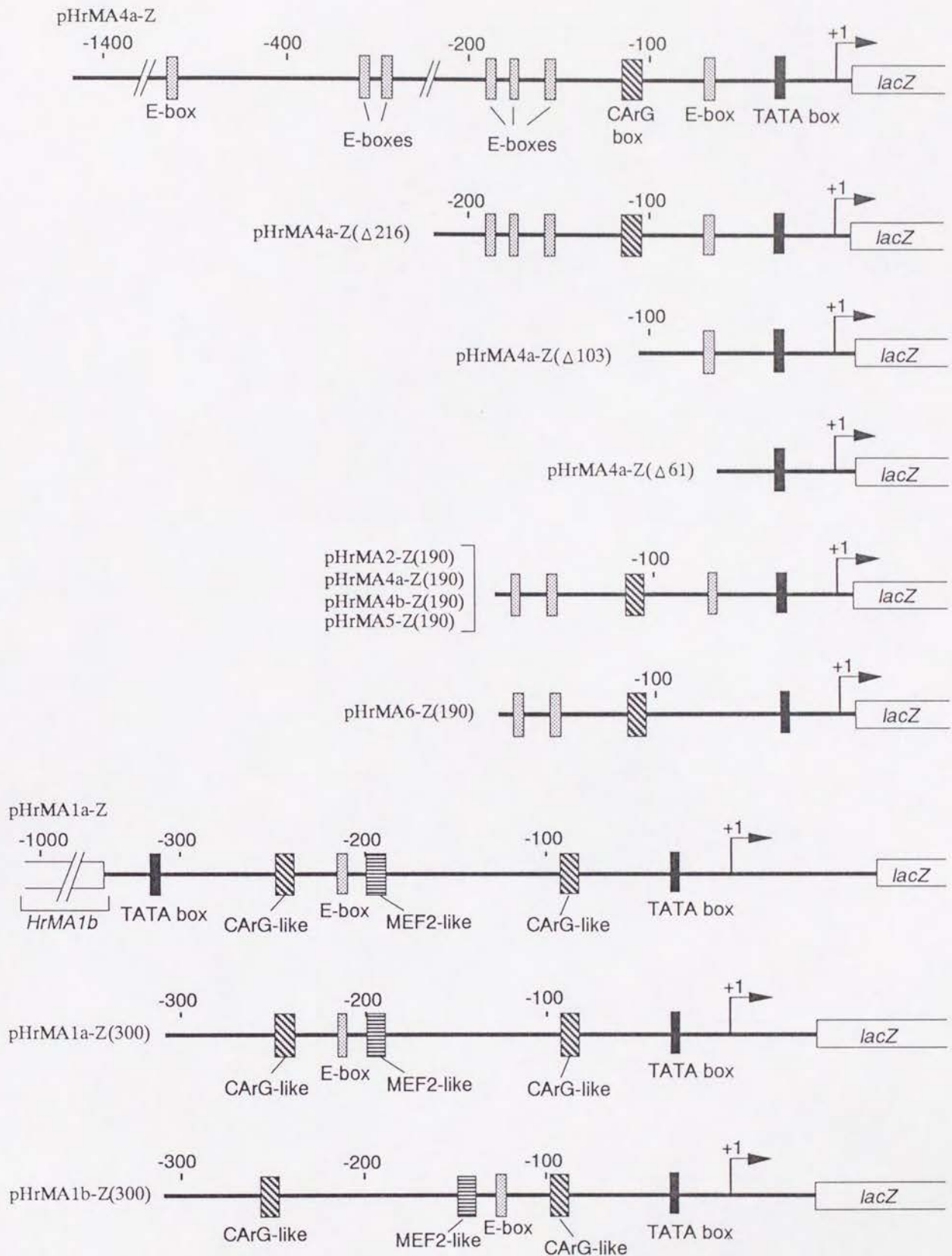


図 16. アクチン遺伝子上流領域と β ガラクトシダーゼ遺伝子の融合遺伝子
12種類の融合遺伝子を作製した。転写開始点を+1とした。Eボックス、CArGボックスおよびその類似配列、MEF-2類似配列、TATAボックス配列の位置を示した。

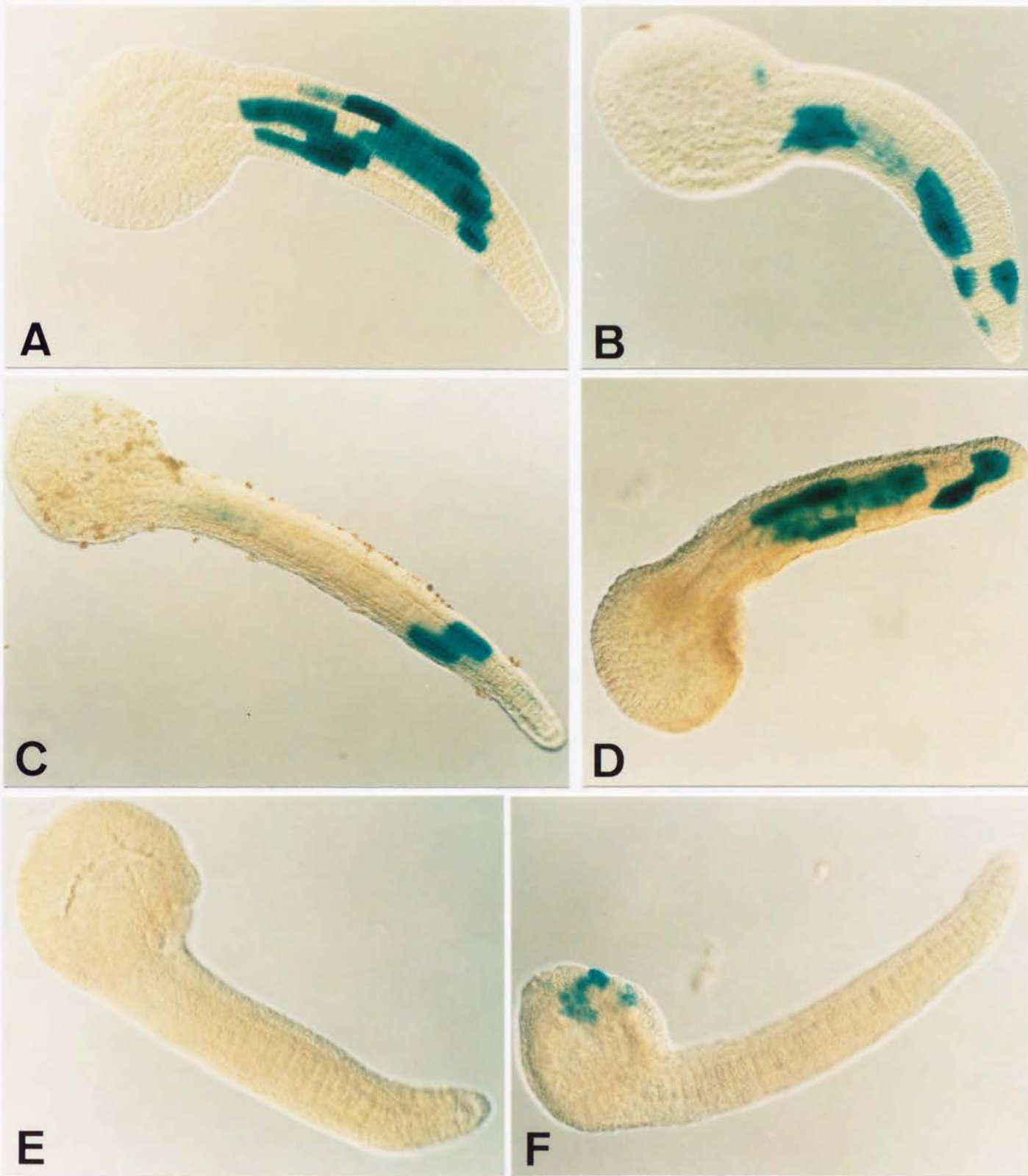


図17. マボヤ卵に注入した *HrMA4a-lacZ* 融合遺伝子の発現

マボヤ卵細胞質にさまざまな *HrMA4a-lacZ* 融合遺伝子を注入し、尾芽胚期まで発生させて、導入した遺伝子の発現を検出した。

(A) pHrMA4a-Z. (B) pHrMA4a-Z(Δ 103). (C) pHrMA4a-Z(Δ 216).

(D) pHrMA4a-Z(Δ 103). (E) pHrMA4a-Z(Δ 61). (F) pHrMA4a-Z(Δ 61).

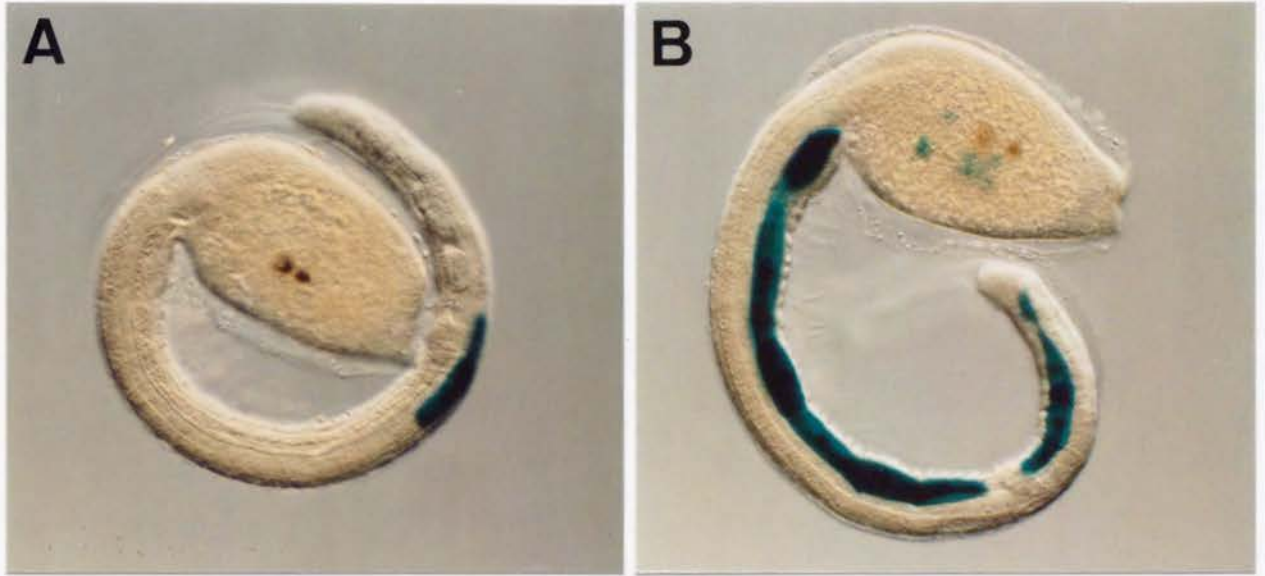
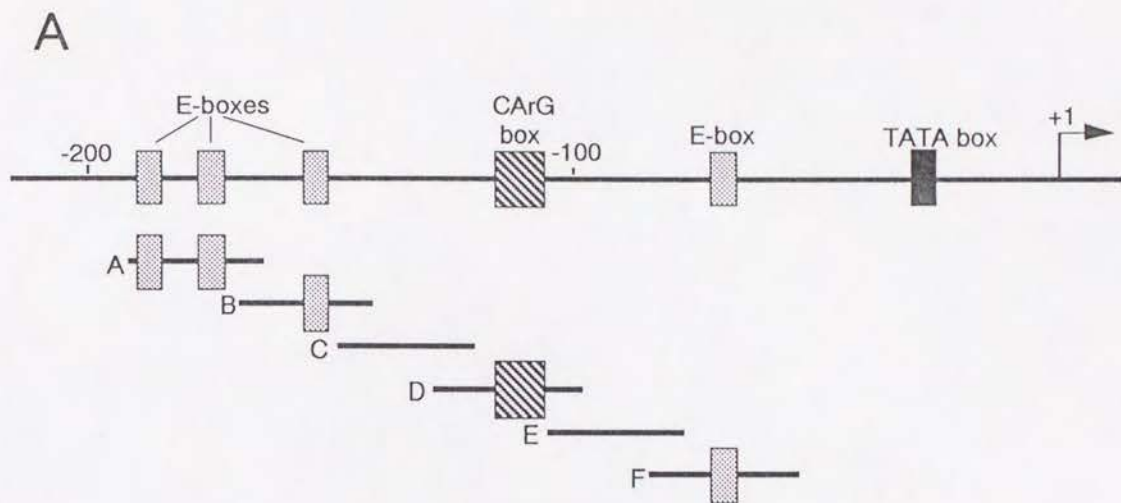


図18. マボヤ卵に注入した pHrMA1a-Zの発現

マボヤ卵細胞質に20万コピーのpHrMA1a-Zを注入し、幼生期まで発生させて、導入した遺伝子の発現を検出した。

(A) 筋肉細胞でのみ発現が認められる。

(B) 第一次系統、第二次系統の両方の筋肉細胞で発現が認められる。表皮細胞でも発現が認められる(頭部の染色)。



B

- oligonucleotide A: 5'-CCAAGTGTAGAACTCAATTGTTTCGCAC-3'
- oligonucleotide B: 5'-CACGTACCGCCAGTTGAACGATATA-3'
- oligonucleotide C: 5'-GATATATCCCACCATGCTATTCTTAA-3'
- oligonucleotide D: 5'-TTAAGTTACTCCTTTTATGGTCATCGCAC-3'
- oligonucleotide E: 5'-GCACTTCTCATTACGAATTGCGC-3'
- oligonucleotide F: 5'-CGCGTGATAACAACACTGTCTTCATTTTTT-3'
- oligonucleotide μ 1: 5'-CGCGTGATAACaTGTCCTTCATTT-3'
- oligonucleotide μ 2: 5'-CGCGTGATAAgAACTGTCTTCATTT-3'
- oligonucleotide μ 3: 5'-CGCGTGATAACAACtTCTTCATTT-3'
- oligonucleotide μ 4: 5'-CGCGTGATAtggtCctgaTTCATTT-3'

図 19. ゲルシフトアッセイに用いた合成オリゴヌクレオチド

(A) 6 種類の合成オリゴヌクレオチド (A, B, C, D, E, F) が対応する *HrMA4a* 上流領域の位置を示した。

(B) ゲルシフトアッセイに用いたプローブの塩基配列。実際は 2 本鎖であるが、ここには一方の鎖のみ示した。 μ 1, μ 2, μ 3, μ 4 の 4 種類はオリゴヌクレオチド F の E ボックス付近の配列を置換したもの。置換した塩基を小文字で示した。A, B, C, D, E, F の両端には、fill-in 反応により放射性標識をするために 5'-GATC-3' 配列を付加した。

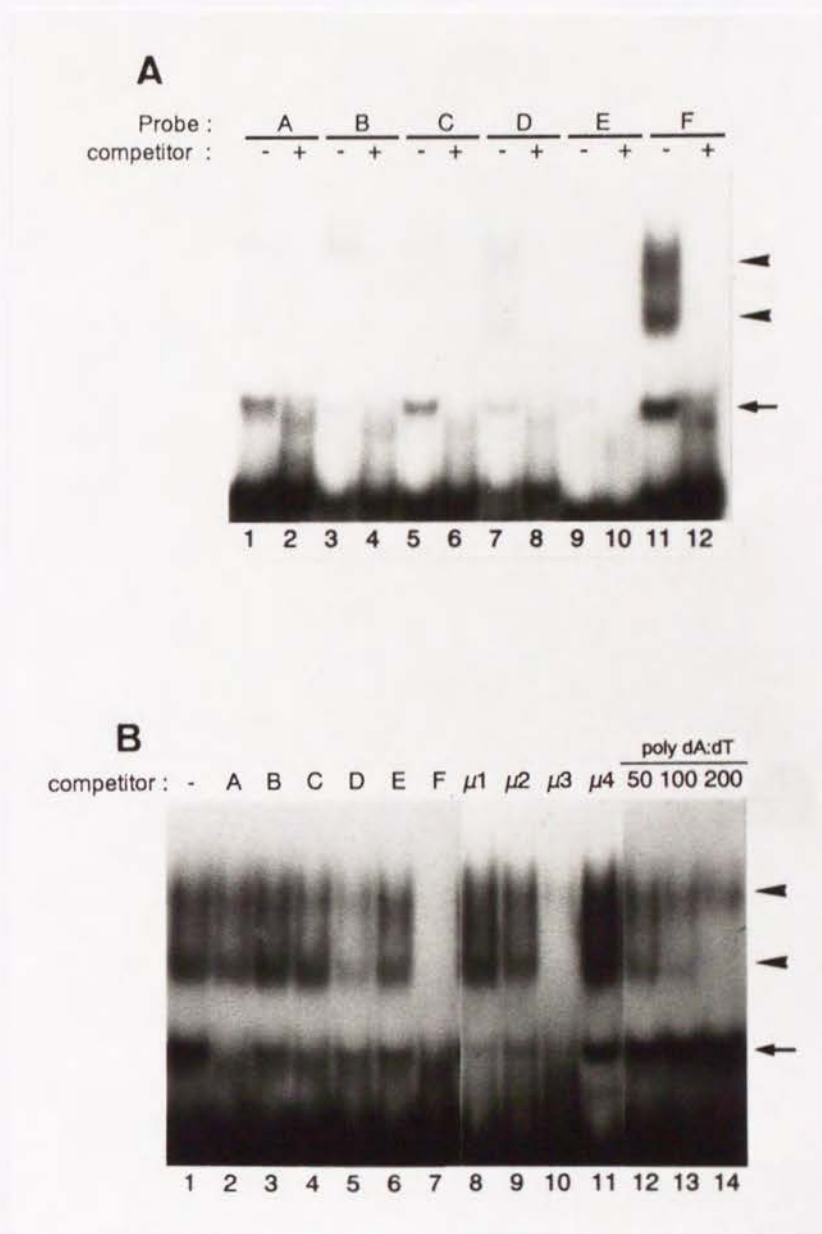


図 20. *HrMA4a* 上流領域への核タンパク質の結合

図 19 に示した 2 本鎖オリゴヌクレオチドをプローブとして用いて、マボヤ神経胚から調製した核抽出液のゲルシフトアッセイをおこなった。

(A) ^{32}P で放射性標識したオリゴヌクレオチド A, B, C, D, E, F をプローブに用いた。+ を記したレーンでは反応液にプローブと同様の配列の非放射性オリゴヌクレオチドを放射性プローブの 1000 倍量加えた。オリゴヌクレオチド F に特異的な 2 本のバンドの位置を矢じりで示した。

(B) ^{32}P で放射性標識したオリゴヌクレオチド F をプローブとして用いた。

レーン 1 : 放射性プローブのみ。レーン 2 - 11 : さまざまな非放射性 2 本鎖オリゴヌクレオチドを放射性プローブの 100 倍量加えた。レーン 12 - 14 : ポリ dA:dT 2 本鎖 DNA をそれぞれ放射性プローブの 50 倍量, 100 倍量, 200 倍量加えた。

表1. さまざまなアクチンのアミノ酸配列の比較^{a)}

アミノ酸 番号 ^{b)}	ラット 骨格筋	ヒト 平滑筋	ホヤ 幼生筋	ヒト 細胞質	ヒトデ 筋肉	ヒトデ 細胞質	ハエ 筋肉	ハエ 細胞質	線虫 筋肉	変形菌	シロイヌ ナズナ
5	Thr	Ser	Thr	Ile	Val	Val	Ala	Val	Val	Val	Ile
6	Thr	Thr	Thr	Ala	Ala	Ala	Ser	Ala	Ala	Gln	Gln
10	Cys	Cys	Cys	Val	Val	Val	Val	Val	Val	Ile	Cys
16	Leu	Leu	Leu	Met	Met	Met	Met	Met	Met	Met	Met
17	Val	Cys	Val	Cys	Cys	Cys	Cys	Cys	Cys	Cys	Val
76	Ile	Ile	Ile	Val	Val	Val	Ile	Val	Val	Val	Val
103	Thr	Thr	Thr	Val	Val	Val	Val	Val	Val	Val	Ile
129	Val	Val	Val	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Thr	Thr	Ala
153	Leu	Leu	Leu	Met	Phe	Phe	Leu	Leu	Leu	Met	Leu
162	Asn	Asn	Asn	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr
176	Met	Met	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu
201	Val	Val	Val	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr
225	Asn	Asn	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln
260	Thr	Thr	Thr	Ala	Thr	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Val
267	Ile	Ile	Ile	Leu	Ile	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Ile
272	Ala	Ala	Ala	Cys	Ala	Ala	Cys	Cys	Ala	Ala	Ala
279	Tyr	Tyr	Tyr	Phe	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr
287	Ile	Ile	Ile	Val	Ile	Val	Val	Val	Ile	Val	Val
297	Asn	Asn	Asn	Thr	Thr	Thr	Asn	Thr	Thr	Val	Ile
365	Ala	Ala	Ala	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser

a) 哺乳類の骨格筋アクチンと細胞骨格（細胞質）アクチンとの間でアミノ酸配列が異なっている箇所について、各種アクチンのアミノ酸配列を比較した。■は哺乳類の骨格筋型と同じアミノ酸、□は哺乳類の細胞骨格型と同じアミノ酸、●はどちらとも異なるアミノ酸を示す。

b) 修飾後のN末端のアスパラギン酸から数えた α アクチンのアミノ酸番号。その他のアクチンではアミノ酸の欠失や挿入があり必ずしもこの番号とは一致しない。

表 2. マボヤ卵に注入した*HrMA4a-lacZ*融合遺伝子の発現

construct	no. of copies injected	no. of experiments	embryos scored	positive			negative	position of ectopic expression
				mu	mu+ectopic	ectopic		
MA4Z	6×10^5	4	29	16	4	4	5	epidermis
MA4Z	1×10^5	4	75	25	0	0	50	
$\Delta 216$	6×10^5	1	10	4	3	1	2	epidermis
$\Delta 216$	2×10^5	2	27	18	0	0	9	
$\Delta 103$	6×10^5	2	34	21	7	2	4	epidermis
$\Delta 103$	1×10^5	10	140	67	1	0	72	epidermis
$\Delta 61$	6×10^5	7	98	0	0	7	91	epidermis
$\Delta 61$	1×10^5	3	35	0	0	0	35	epidermis

マボヤ卵にさまざまな*HrMA4a-lacZ*融合遺伝子を注入した場合の発現部位と例数を示す。muは筋肉のみで発現が認められるもの、ectoは筋肉以外でのみ発現が認められるもの、mu+ectoは両方で発現が認められるものの例数である。

表 3. マボヤ卵に注入したpHrMA1a-Zの発現

no.of copies injected	embryos scored	positive			negative	posiotion of ectopic expression
		Mu	Mu+Ectopic	Ectopic		
2×10^5	9	5	0	0	4	epidermis
	14	10	1	0	3	
	28	19	0	0	9	
	49	27	0	0	22	
total	100	61	1	0	38	
1×10^5	20	4	0	0	16	
	12	2	0	0	10	
total	32	6	0	0	26	

マボヤ卵にpHrMA1a-Zを注入した場合の発現部位と例数を示す（表 2 の説明を参照）.